



Effets de perturbateurs endocriniens sur le développement du squelette

Thuy-Anh Auxière

► To cite this version:

Thuy-Anh Auxière. Effets de perturbateurs endocriniens sur le développement du squelette. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05S015 . tel-00932800

HAL Id: tel-00932800

<https://theses.hal.science/tel-00932800>

Submitted on 17 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale « Biologie Biotechnologie »

Unité INSERM UMR-S 747 «Toxicologie, Pharmacologie et Signalisation Cellulaire »

Effets de perturbateurs endocriniens sur le développement du squelette

Par Thuy-Anh AUXIETRE

Thèse de doctorat de Biologie « Os et Articulation »

Dirigée par Jean-François Savouret

Présentée et soutenue publiquement le 14 novembre 2013

Devant un jury composé de :

M. Jean-Pierre CRAVEDI, directeur de recherche,

Rapporteur

M. Frédéric MALLEIN-GERIN, directeur de recherche,

Rapporteur

Mme Ariane BERDAL, directeur de recherche,

Examinatrice

M. Jean-François SAVOURET, directeur de recherche,

Directeur de thèse

Mme Marie-Thérèse CORVOL, directeur de recherche émérite

Invitée

Résumé :**Effets de perturbateurs endocriniens sur le développement du squelette.**

Les polluants environnementaux, en particulier les perturbateurs endocriniens (PE), agissent à très faibles doses sur des cibles multiples. Les effets rapportés portent en majorité sur les organes de reproduction. Très peu d'études ont porté sur le squelette alors que le cartilage et l'os sont sous un puissant contrôle hormonal, depuis le stade fœtal où le système hormonal se met en place jusqu'au vieillissement, en passant par la naissance (hormones thyroïdiennes, hormone de croissance), la puberté et la ménopause chez la femme (stéroïdes sexuels).

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de polluants anti-androgènes (vinclozoline, V et métabolite actif M2) ou xénestrogènes (génistéine, G; bisphénol A, BPA), *in vivo* sur le développement du squelette du rat Wistar et *in vitro* sur les marqueurs de différenciation chondrogéniques.

Les effets *in vivo* ont été étudiés à des doses inférieures aux "No Observed Adverse Effect Levels" (NOAEL) fixés par les instances européennes (EFSA) et internationales (US EPA). Des rattees ont été exposées à V, G seuls, combinés (GV) et/ ou associés au BPA (BGV), et ce de la conception des petits jusqu'à leur sevrage (J30) ou leur sacrifice (J30, J110). Les effets ont été recherchés sur des petits de mères et portées différentes, quatre pour chaque traitement, âge et sexe.

Les effets *in vitro* du métabolite M2 de la Vinclozoline, associé ou non avec G et BPA, ont été étudiés sur l'expression de marqueurs chondrogéniques en utilisant : 1) un modèle murin de cellules souches inductibles vers la voie chondrogénique (C1) pour les effets sur la différenciation chondrogénique précoce et 2) des chondrocytes de souriceaux nouveau-nés, différenciés en culture primaire ou dédifférenciés (passages répétés). Comparaison avec les effets du bFGF, facteur de dédifférenciation chondrogénique.

Résultats : *In vivo*, l'exposition à V, seule ou associée à G ou au BPA induit chez les rattees F1 exposées, une cannelure de la queue, discrète mais perceptible à la palpation en regard de chaque articulation intervertébrale. Les xénestrogènes tendent à réduire cet effet de V. Les rats et les animaux F2 ne sont pas atteints. L'examen par micro CT-scan montre une augmentation significative de la largeur des apophyses transverses (ITA) des vertèbres, et une diminution de la hauteur des corps vertébraux chez les rattees F1 exposées en regard des contrôles. Ces modifications anatomiques rappellent certaines pathologies génétiques des collagènes (dysplasies épiphysaires) chez l'homme. Elles sont absentes chez les rats F1 et les animaux F2. Elles sont en partie transitoires car présentes à J30 (effets sur ITA et longueur) quand seul l'effet sur l'ITA perdure à J110.

L'examen histologique des cartilages de croissance des corps vertébraux montre un déséquilibre entre les zones de prolifération et d'hypertrophie qui évoque une modification de la maturation du cartilage de type estrogénique. Ces effets sont ici aussi transitoires et majoritairement observés chez les rattees. L'effet plus prononcé du BPA lisse toutes les autres activités. Cela suggère que les PE pourraient moduler la différenciation du cartilage de croissance. C'est ce qui a été étudié *in vitro*.

In vitro. Le premier objectif était d'évaluer les effets des PE sur la dynamique d'induction chondrogénique (cellules C1). Nous montrons que l'addition de M2 seul ou avec G ou BPA modifie le processus de maturation du collagène2 sans effet sur les autres marqueurs (SOX9, Agrécane, Col10). M2 prolonge l'expression de COL2A immature et retarde son remplacement par l'isoforme COL2B. Le second objectif était d'étudier les effets des PE sur la régulation de l'expression de COL2A au cours du processus de dé-différenciation des chondrocytes *in vitro*. L'expression de COL2A augmente avec le degré de dédifférenciation cellulaire (passages successifs) et double en présence de M2, G et BPA. Cet effet dépend des récepteurs aux estrogènes (ER) et des voies p38-MAPK. Les PE pourraient donc agir par l'intermédiaire de l'ERα membranaire couplé au système cavéoline/p38. Des effets similaires sont observés en présence de bFGF. Nos données suggèrent que le bFGF et les PE modulent la différenciation chondrogénique au niveau de l'expression de COL2A sans effet sur le COL2B. Ces effets pourraient être en partie médiés par une protéine du splicing.

Conclusion : Les PE pourraient interférer avec la différenciation du cartilage de croissance et donc le développement du squelette, en retardant la maturation du collagène de type 2. La persistance du COL2A pourrait induire une fragilisation ultérieure à bas bruit de l'ossature, lors du vieillissement. Ce COL2A en excès, ayant une affinité pour les facteurs de croissance, pourrait séquestrer ces facteurs et influencer sur la vitesse de dégradation du cartilage dans des pathologies telles que l'arthrose.

Abstract :**Effects of Endocrine Disruptors on skeletal development**

Environmental pollutants, particularly Endocrine Disruptors (ED), show effects on multiple targets at very low doses. Mostly known effects target reproductive organs. Very few studies are conducted on skeleton, although cartilage and bone are under potent hormonal control, from fetal stage, where hormonal system takes place, until aging, through birth stage (thyroid hormones, growth hormones), puberty and menopause for women (steroid hormones).

The aim of this work is to study effects of anti-androgenic pollutants (vinclozolin, V, and its active metabolite M2) or xenoestrogens (genistein, G; bisphenol A, BPA), *in vivo* on Wistar rat skeletal development and *in vitro* on chondrogenic differentiation markers.

***In vivo* effects** were studied at doses below the “No Observed Adverse Effect Levels” (NOAEL) established by European and American agencies (EFSA and US EPA respectively). Female Wistar rats were exposed to V and G alone, in combination (GV) and/or associated to BPA (BGV), from pups conception until weaning (d30) or sacrifice (d30, d110). Effects were investigated on offsprings from different mothers and litters, on four animals by treatment, age and gender.

***In vitro* effects** of M2 metabolite of Vinclozolin, combined or not to G and BPA, were studied on chondrogenic markers expression using : 1) inducible murine stem-cells model towards chondrogenesis (C1) to study effects on early chondrogenic differentiation and 2) post-natal mouse differentiated chondrocytes, in primary culture or dedifferentiated chondrocytes by successive passages. Comparison with bFGF, a dedifferentiation factor for chondrocytes.

Results : *In vivo*, exposure to V, alone or combined to G or BPA, induce discrete but palpable annealing in F1 treated female rat tails, in front of each intervertebral articulation. Xenoestrogens tend to decrease V effect. Male rats and F2 offsprings were not affected. Micro-CT Scan analysis shows significative increase of vertebrae inter transverse apophyses (ITA) distance, and decrease of vertebral body height in F1 female rats comparing to control animals. Anatomical modifications recall human collagen genetic diseases (epiphyseal dysplasias). They are absent in F1 male rats and F2 offsprings. Furthermore they are partly transient, ITA and height effects being present at d30 whereas ITA effect alone remains until d110. Histological analysis of vertebral body growth plate shows unbalance between proliferative and hypertrophic zones, which evokes estrogenic acceleration of cartilage maturation. Those effects are still transient and mainly observed in female rats. BPA activity is dominant above G and V effects. This result suggests ED can modulate growth plate cartilage differentiation, which was studied *in vitro*.

***In vitro* :** First, we aimed to evaluate eventual role of ED on the dynamic of the chondrogenic differentiation process. We show that M2 addition, alone or in combination with G or BPA, modifies collagen 2 maturation process without any effect on other markers (SOX9, Agrecan, COL10). M2 addition extends immature isoform COL2A expression and delays its replacement by mature isoform COL2B. Second, we studied the effects of ED on the regulation of COLA expression through the dedifferentiating process of chondrocytes *in vitro*. COL2A expression increases with cell dedifferentiation degree (successive passages) and double with M2, G and BPA. No other chondrogenic marker was modified. This effect depends on estrogen receptors (ER) and p38-MAPK pathway. Thus ED could act through membrane ER α coupled to p38/caveolin system. Similar effects were observed with bFGF. Our data suggest that bFGF and ED modulate chondrogenic differentiation at the level of COL2A expression, without effect on COL2B. These effects could be partly mediated through a splicing protein.

Conclusion: ED could interfere with growth plate cartilage differentiation and in consequence with skeletal development, by delaying type 2 collagen maturation. COL2A persistence could induce later weakening through aging. COL2A in excess could have affinity for growth factors and sequester them, and then modify degradation speed in pathologies like osteoarthritis.

Mots clés (français) : cartilage, plaque de croissance, collagène de type 2, maturation, NOAEL, vinclozoline, xenoestrogènes.

Keywords : cartilage, growth plate, type 2 collagen, maturation, NOAEL vinclozolin, xenoestrogens

[A Jean-François et Maité]

Remerciements

Je remercie Monsieur François SIGAUX, directeur de l'école doctorale, de m'avoir permis de passer cette thèse.

Je remercie Monsieur Jean-Pierre CRAVEDI et Monsieur Frédéric MALLEIN-GERIN d'avoir accepté la tâche de rapporteurs malgré leurs emplois du temps chargés. Je les remercie pour toute l'attention qu'ils ont portée à ce travail, ainsi que pour avoir accepté de se déplacer jusqu'à Paris pour évaluer ce travail.

Je remercie Madame Ariane BERDAL d'avoir accepté d'être examinatrice à mon jury malgré son emploi du temps chargé également.

Je remercie Monsieur Robert BAROUKI de m'avoir accueillie au sein de l'unité U747.

Je remercie Monsieur François RANNOU de m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Je tiens à remercier spécialement Monsieur Jean-François SAVOURET de m'avoir encadrée durant ce travail de thèse, avec toute la patience, l'enthousiasme et les idées qui ont permis l'accomplissement de ce travail.

Je tiens à remercier aussi particulièrement Madame Maité CORVOL pour la patience prodiguée lors de ces années de thèse, ainsi que pour ses conseils et sa disponibilité, et le savoir qu'elle transmet avec passion tous les jours.

Je tiens à remercier aussi l'ensemble de l'équipe 2 pour son accueil, son aide et sa gentillesse : Lydia, pour son aide et pour toutes les chansons chantées ensemble ; Caroline, pour ses bons conseils et sa gentillesse ; François, pour son soutien et son écoute. Je remercie également celles qui sont parties : à Marie-France, qui m'a tout appris avec bonne humeur et a partagé son expérience du labo et de la vie ; à Irène pour son aide et son écoute ; à Magda, Khadija et Marie-Claude. Merci à mes co-thésardes préférées, Elissar et Nabila, qui ont été là dans le rire et dans les difficultés, merci pour votre soutien quotidien. Petite pensée aussi pour les

étudiants qui sont venus chez nous et n'ont pas cessé de renouveler la bonne humeur présente au sein de l'équipe.

Je tiens à remercier aussi l'ensemble de l'ancienne équipe 5, et plus particulièrement Mme Odile KELLERMAN pour m'avoir permis de travailler sur le modèle C1, ainsi que Mme Anne POLIARD pour ses conseils sur l'histologie, ainsi que Anne BAUDRY, et Mme Marie-Noëlle MONIER pour son initiation à la culture C1.

Je remercie Mme Linda SANDELL pour le don de l'anticorps anti-COL2A qui nous a permis d'étudier la protéine en immunoblot et en immunocytochimie.

Je remercie Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER et le « réseau CIME » ainsi que Jacques AUGER et le réseau « PNRPE » pour leurs conseils.

Je remercie également l'ensemble de l'unité UMR-S 747 et plus particulièrement les autres doctorants, Clémentine et le rire que tu distribues à tout le monde, Alix, je ne te remercierai jamais assez pour R, Nolwenn, merci pour Zotero, et vous toutes pour les fous rires : Ludmila, Julia, Sacha, Alex, Aline ... ainsi que ceux que j'oublie de citer (pardon !) et ceux qui sont partis (Stéphane, Ariane, Graziella ...). Merci à tous les membres de l'unité 747 qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse et qui l'ont rendu aussi agréable que possible.

Je remercie enfin Sébastien qui m'a supportée et soutenue depuis le début, ainsi que mes parents pour leur soutien inconditionnel, et mes beaux-parents pour leur compréhension.

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
INTRODUCTION	16
I. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.....	16
1. GENERALITES.....	16
1.1. La notion de mélange.....	17
1.2. La fenêtre d'exposition	18
1.3. La toxicité transgénérationnelle.	19
2. MOLECULES ETUDIEES.....	20
2.1. La génistéine.....	20
2.1.2 Mécanismes d'action et effets de la génistéine.....	21
2.1.3 Devenir de la génistéine dans l'organisme	22
2.2. La vinclozoline	23
2.2.1 Sources et données d'exposition	23
2.2.2 Effets connus de la vinclozoline et mécanismes d'action	24
2.2.3 Devenir dans l'organisme.....	24
2.3. Le bisphénol A	25
2.3.1 Sources et données d'exposition	25
2.3.2 Effets connus du BPA et mécanismes d'action	26
2.3.3. Devenir dans l'organisme.....	27
II. LE CARTILAGE.....	29
1. COMPOSITION DU CARTILAGE.....	30
1.1. Le chondrocyte.....	30
1.2. La matrice extracellulaire.....	31
1.2.1. Les protéoglycanes.....	32
1.2.2. Le collagène.....	34
c. Dégradation des collagènes.....	38
d. Le collagène de type 2 (COL2).....	38
1.2.3. Les protéines non collagéniques	43
2. LE RENOUVELLEMENT DES PROTEINES MATRICIELLES	44
3. LE DEVELOPPEMENT DU SQUELETTE OSSEUX	44
3.1. Facteurs de transcription impliqués dans l'expression des marqueurs chondrogéniques.....	46
3.2. La maturation du cartilage de croissance et l'ossification endochondrale.....	47
3.2.1. Pénétration vasculaire et formation de la plaque de croissance épiphysaire.....	48
3.2.2. Le cartilage de croissance, siège d'un processus de maturation cellulaire des chondrocytes... ..	49
3.2.3. Facteurs intervenant dans le contrôle de la croissance.....	51
a. Facteurs de croissance	51
b. Facteurs sériques, rôle des hormones.	52
III. CARTILAGE ARTICULAIRE ADULTE PATHOLOGIQUE : L'ARTHROSE.	54
1. DEGRADATION DU CARTILAGE	54
1.1 Causes de l'arthrose.....	55
1.2. Facteurs de risque de l'arthrose	55
2. EXPRESSION DE COL2A CHEZ L'ADULTE ET IMPLICATION DANS L'ARTHROSE.	56
3. REGULATION DE L'EXPRESSION DE COL2A	58
IV. LES FACTEURS FGFS.	59
1. STRUCTURE PROTEIQUE DES FGFS	59

2. LES RECEPTEURS AUX FGFs (FGF-R)	60
3. VOIES DE SIGNALISATION DES FGFs.....	61
4. ROLES DES FGFs	62
4.1. Rôle des FGFs lors de l'embryogenèse.....	63
4.2. Implication des FGFs lors du développement du squelette.....	63
4.3. FGF-Rs et la formation du squelette.....	64
5. LE FGF2 OU BASIC FGF (bFGF)	66
6. bFGF ET SQUELETTE OSTEO-ARTICULAIRE.....	68
6.1. bFGF , facteur de prolifération des chondrocytes.....	69
6.2. bFGF, facteur de dédifférenciation des chondrocytes.....	70
6.3. bFGF, facteur de dégradation de la matrice du cartilage articulaire	70
V. POLLUANTS ATMOSPHERIQUES ET SQUELETTE.	73
1. PREMIERES OBSERVATIONS : LES METAUX LOURDS.....	73
2. LIGANDS AHR (DIOXINES ET HYDROCARBURES AROMATIQUES) ET SQUELETTE.....	73
3. ROLE DES PESTICIDES	74
4. PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET SQUELETTE.....	74
4.1. Génistéine et squelette	75
4.2. Vinclozoline et squelette.....	76
4.3. BPA et squelette.....	76
OBJECTIFS DU TRAVAIL	78
MATERIELS ET METHODES	79
I. PARTIE <i>IN VIVO</i>	79
1. ANIMAUX ET PROTOCOLES D'EXPOSITION.....	79
1.1. Animaux.....	79
1.2. Procotole de doses sub-NOAEL.....	80
1.3. Protocole CIME, doses très inférieures au NOAEL (« Far-NOAEL »)	81
2. ANALYSE AU MICRO-CT SCAN.....	82
3. ANALYSE HISTOMETRIQUE	84
4. ANALYSE STATISTIQUE.....	84
II. PARTIE <i>IN VITRO</i>.....	85
1. LE MODELE C1.....	85
1.1 Culture des cellules C1	85
1.2 Traitements et inductions	86
1.3 Extraction des ARN totaux	86
2. LES MODELES DE CHONDROCYTES SOURIS.....	87
2.1 Culture des chondrocytes	87
2.2 Traitements et inductions	88
2.3 Extraction des ARN totaux	88
3. RETRO-TRANSCRIPTION	88
4. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE SEMI-QUANTITATIVE (SQ-PCR).....	89
5. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE QUANTITATIVE EN TEMPS REEL (QRT-PCR)	89
6. ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES D'INTERET.....	92
6.1 Extraction des protéines totales	92
6.2. Dosage des protéines	92
6.3. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	93
6.4 Transfert des protéines	93
6.5. Caractérisation des protéines d'intérêt par immunoblot	94
7. TRANSFECTION TRANSITOIRE DES CHONDROCYTES	95

8. IMMUNOCYTOCHIMIE	96
8.1 Cartilage de souris	96
8.1.1. Préparation des échantillons.....	96
8.1.2. Inclusion dans la paraffine	96
8.1.3. Marquage des lames	97
8.2 Cellules C1	97
8.2.1 Préparation des lames.....	97
8.2.2. Marquage des lames	98
9. STATISTIQUES	99

PREMIERE PARTIE : RESULTATS IN VIVO 100

I. RESULTATS	101
1. POIDS CORPOREL DES ANIMAUX.....	101
2. MODIFICATIONS ANATOMIQUES DES VERTEBRES	102
3. ANALYSE HISTOMETRIQUE DES VERTEBRES.....	104
II. CONCLUSION ET DISCUSSION.....	108

DEUXIEME PARTIE, RESULTATS IN VITRO (1) : EFFETS DES PE SUR UN MODELE D'INDUCTION

CHONDROGENIQUE 112

I. RESULTATS	112
1. EFFETS DE G, V ET SUR L'INDUCTION CHONDROGENIQUE PRECOCE DANS LE MODELE C1.	112
2. LES PE N'ONT PAS D'EFFET SUR L'AUGMENTATION DE L'EXPRESSION DE SOX9 INDUITE PAR LA DEX.....	114
3. EFFETS DES PE SUR LES MARQUEURS PHENOTYPIQUES DES AGREGATS CHONDROGENIQUES DEX-INDUITS.....	116
4. ETUDE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE COL2A ET DE COL2B DANS LES AGREGATS EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE.	119
5. ETUDE DES EFFETS DE M2 SUR L'EXPRESSION DE COL2A ET COL2B	121
6. EFFET DE L'HYPOXIE SUR LA VITESSE D'INDUCTION CHONDROGENIQUE DEX-INDUITE ET SUR LES EFFETS DE M2.	124
II. CONCLUSIONS ET DISCUSSION.....	127

TROISIEME PARTIE, RESULTATS IN VITRO (2) : EFFETS DES PE SUR UN MODELE DE CHONDROCYTES EN CULTURE 130

I. RESULTATS	130
1. EXPRESSION DE COL2A DANS LE CARTILAGE <i>IN VIVO</i> CHEZ LA SOURIS NOUVEAU-NE ET CHEZ L'ADULTE.	130
2. EXPRESSION DE COL2A DANS LES CHONDROCYTES EN CULTURE EXTRAITS DE CARTILAGE DE SOURICEAUX.	132
3. L'EXPRESSION DE COL2A DES CHONDROCYTES EN P0 N'EST PAS MODIFIEE PAR LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS (PE).	135
4. L'EXPRESSION DE COL2A DES CHONDROCYTES EN P0 EST MODULEE PAR LE bFGF.	136
5. L'AUGMENTATION DE COL2A PAR LE bFGF EST EN PARTIE TRANSCRIPTIONNELLE, INDIRECTE ET IMPLIQUE LA PROTEINE D'EPISSAGE TIA-1.	137
6. LES PE SONT ACTIFS SUR LE COL2A EXPRIME PAR LES CHONDROCYTES DEDIFFERENCIES APRES PASSAGE EN P3 ET LEURS EFFETS SONT DE TYPE ESTROGENIQUE.	141
II. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	143

CONCLUSION GENERALE 149

BIBLIOGRAPHIE 149

Table des illustrations

Figure 1 : Structure chimique plane de la génistéine et analogie structurale avec l'estradiol..	20
Figure 2 : Structure chimique plane de la vinclozoline et obtention du métabolite M2 par décarboxylation.	23
Figure 3 : Structure chimique plane du bisphénol A.....	25
Figure 4 : Topographie des cartilages chez l'homme.....	29
Figure 5 : Organisation de la matrice autour du chondrocyte dans le cartilage articulaire normal sain	31
Figure 6 : Localisation des différentes catégories de protéoglycanes du chondrocyte et du collagène 2	33
Figure 7 : Schéma d'une molécule de procollagène	35
Figure 8 : Les différentes étapes de la biosynthèse du collagène	35
Figure 9 : Séquence codante du gène de procollagène 2 α 1 de souris	39
Figure 10 : L'existence d'un épissage alternatif au sein du gène du <i>Col2a1</i> peut donner naissance à deux isoformes COL2A et COL2B, transcrites et traduites.....	40
Figure 11 : Représentation schématique des différentes étapes menant la construction du squelette	45
Figure 12 : Les différentes étapes de l'ossification endochondrale	48
Figure 13 : Les différentes étapes de la différenciation chondrogénique au sein de la plaque de croissance, et les facteurs qui la contrôlent	50
Figure 14 : Tableau des sous-familles des FGFs et leurs séquences protéiques	60
Figure 15 : Représentation schématique d'un monomère de récepteur FGFR	61
Figure 16 : Diversité des différentes voies impliquées dans la signalisation cellulaire des FGFs/FGF-Rs.	62
Figure 17 : Représentation schématique de l'expression de différents FGFs et leurs récepteurs au cours de la squelettogenèse	64
Figure 18 : Structure du précurseur de la protéine bFGF (isoforme de 18 kDa)	67
Figure 19 : Schéma de la régulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes de la plaque de croissance par l'axe PTHrP/Ihh, les FGFs et les BMPs.	69
Figure 20 : Schéma des différentes voies de signalisation pouvant être impliquées par bFGF dans la dégradation du cartilage articulaire	72
Figure 21 : Analyse type au micro-CT-Scan des vertèbres caudales.....	84
Figure 22 : Choix des oligonucléotides pour amplifier l'expression du collagène de type 2	92
Figure 23 : Localisation des épitopes reconnus par les anticorps utilisés pour discriminer l'isoforme COL2A.	99
Figure 24 : Graphiques des poids des animaux témoins comparés aux animaux traités.....	102
Figure 25 : Analyse de la distance entre les apophyses transverses par micro-CT-Scan	103
Figure 26 : Analyse par micro-CT-Scan de la longueur moyenne cumulée des vertèbres (v5- v8)	104
Figure 27 : Morphologie histologique d'une section du rachis caudal dans la région v5-v8..	106
Figure 28 : Mesure histométrique de l'épaisseur de la plaque de croissance du corps vertébral, de la zone proliférative et de la zone hypertrophique	107
Figure 29 : Analyse histométrique de l'épaisseur de la plaque de croissance du corps vertébral, de la zone proliférative et de la zone hypertrophique.....	108
Figure 30 : Effets de M2 sur l'expression de Sox9 après induction chondrogénique des cellules C1.....	116
Figure 31. Expression des transcrits de marqueurs chondrogéniques et non chondrogénique en fonction du temps, dans les agrégats DEX-induits et en conditions basales sans effecteurs.	117

Figure 32. Effets de G, V et M2 à $[10^{-6}M]$ sur l'expression des marqueurs phénotypiques des agrégats DEX-induits..	119
Figure 33 : Expression des ARNm des isoformes COL2A et COL2B au cours de l'induction chondrogénique Dex-dépendante des agrégats C1	120
Figure 34 : Localisation de COL2A par immunocytochimie (ICC) dans les agrégats Dex-induits entre J10 et J18.....	121
Figure 35 : Localisation de COL2A par ICC dans les agrégats Dex-induits entre J22 et J32.....	122
Figure 36 : Effet de l'addition de M2 sur l'expression de COL2A et COL2B.	123
Figure 37. Effet du M2 sur l'expression de COL2A dans les agrégats DEX-induits au cours du temps.....	123
Figure 38. Rôle de l'hypoxie sur l'expression des ARNm de COL2A et COL2B par les agrégats Dex-induits dans la voie chondrogénique.	125
Figure 39. Effets du M2 sur le rapport COL2B/COL2A en normoxie et en hypoxie.....	126
Figure 40 : Analyse par ICC de l'expression de COL2A dans le cartilage épiphysaire d'une articulation métatarso-phalangienne de souris âgé de 6 jours.....	131
Figure 41. Expression de COL2A dans le cartilage articulaire de souris âgée de plus de 1 an.	131
Figure 42 : Comparaison de l'expression des transcrits de COL2A et COL2B dans le cartilage de souris <i>in vivo</i> et dans les chondrocytes extraits du cartilage et mis en culture.	134
Figure 43 : Effet du serum sur l'expression de COL2A et COL2B dans les chondrocytes en culture primaire (P0).	135
Figure 44 : Effets de M2 seul ou combiné à G et/ou BPA sur l'expression de COL2A et de COL2B par les chondrocytes en culture primaire (P0).	136
Figure 45 : Effet du bFGF seul ou en combinaison avec des PE, sur l'expression de COL2A et COL2B dans les chondrocytes en P0.	138
Figure 46. Effets d'un inhibiteur de la transcription (DRB) et d'un inhibiteur de la traduction (CHX) sur l'expression de COL2A et COL2B sur les chondrocytes P0 traités ou non par le bFGF ± PE.	138
Figure 47 : Représentation des demi-vies de COL2A en conditions basales et en présence de bFGF dans les chondrocytes en P0.	140
Figure 48. Effet de l'inhibition de l'expression de TIA-1 par un siRNA sur la stimulation de COL2A par le bFGF.	140
Figure 49. Effet de M2 seul ou combiné à G ou BPA sur l'expression de COL2A et COL2B par les chondrocytes P3.	141
Tableau 1. Protocoles d'expositions des deux études <i>in vivo</i>	82
Tableau 2. Liste des oligonucléotides utilisés pour l'amplification en SQ-PCR et en qRT-PCR	91
Tableau 3. Séquences des brins sens et anti-sens des siRNA dirigés contre TIA-1 lors de la transfection transitoire.	96
Tableau 4 : Les différentes étapes de l'induction chondrogénique dans le modèle C1	114
Tableau 5 : Protocole expérimental des effets des PE.	115
Tableau 6. Comptage des agrégats spécifiquement marqués avec l'anticorps anti-COL2A à J22 et J36.	124

Liste des abréviations

ADAMTS : A disintegrin and a metalloproteinase with thrombospondin motifs

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BMP : Bone morphogenic protein

BPA : bisphénol A

CHX : Cycloheximide

COL : Collagène

CS : Chondroïtine sulfate

DES : Diéthylstilbestrol

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DRB : 5,6-Dichlorobenzimidazole 1- β -ribofuranoside

DS : Dermatane sulfate

ER : Estrogen receptor = récepteur aux estrogènes

ERO = ROS : Espèces réactives de l'oxygène

FACIT : Fibre-associated collagens with interrupted triple helices

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : Fibroblast growth factor receptor

G : génistéine

GAG : glycosaminoglycane

GH : Growth Hormone

GP : Growth Plate = plaque de croissance

Hif1 α : Hypoxia inducible factor α

HS : Heparane sulfate

ICC : Immunocytochimie

IGF1 : Insulin growth factor 1

Ihh : Indian Hedgehog

IL1- β : Interleukin 1 β

ITA : Inter Transverse Apophysis

IVD : Intervertebral disc

KI : Knock-in

KO : Knock-out

KS : Keratane sulfate
LMR : Limite maximale de résidus
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MEC : Matrice Extracellulaire
MMP : Matrix metalloproteinase
NFκB : Nuclear factor kappa B
NLS : Nuclear localization signal
NO : Nitric oxyde
NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
PAL : Phosphatase alcaline
PBS : Phosphate Buffered Saline
PE : Perturbateurs endocriniens
PG : Protéoglycane
PIIANP : Procollagene 2A N-propeptide
PTH : Parathyroid hormone
PTHrP : Parathyroid hormone related protein
Shh : Sonic Hedgehog
TGFβ : Transforming growth factor β
TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNFα : Tumor necrosis factor α
V : vinclozoline
VEGF : Vascular endothelial growth factor
Wnt : Wint, ou Wingless integration site

Valorisation du travail

Ce travail fera l'objet de deux publications :

Sub-NOAEL amounts of vinclozolin and xenoestrogens target rat chondrogenesis *in vivo*. Auxière, TA; Dumontier, MF; Balguy, I; Frapart, Y, Canivenc-Lavier, MC, Berges, R; Boudalia, S; Auger, J; Corvol, MT; Savouret, JF. Submitted to Toxicology, currently in revision. Nov. 2013.

Endocrine disruptors target type II collagen biosynthesis in chondrocytes *in vitro*. Auxière, TA; Dumontier, MF; Canivenc-Lavier, MC; Kellerman, O; Savouret, JF; Corvol, MT. Manuscrit en préparation pour Ann. Rheum. Diseases, Nov. 2013.

Il a déjà fait l'objet de communications orales et de posters :

Auxière, TA; Dumontier, MF; Balguy, I; Canivenc-Lavier, MC ; Auger, J ; Corvol, MT; et Savouret, JF. Les Perturbateurs Endocriniens ciblent la maturation du collagène de type 2 dans des chondrocytes *in vitro*. Poster. Réunion PNRPE, « Recent advances on health effects of endocrine disrupters », décembre 2012, Paris.

Auxière, TA ; Dumontier, MF; Balguy, I; Canivenc-Lavier, MC ; Auger, J ; Corvol, MT; et Savouret, JF. Endocrine disruptors target chondrogenesis *in vivo*. Poster. Réunion PNRPE, « Recent advances on health effects of endocrine disrupters », décembre 2012, Paris.

Auxière, TA. Effets de Perturbateurs Endocriniens sur le développement du squelette. Présentation. Réunion CIME, juillet 2012, Dijon.

Auxière, TA. Endocrine disruptors target skeletal development. Communication orale. EUROTOX, juin 2012, Stockholm.

Auxière, TA, Dumontier, MF, Corvol, MT, Savouret, JF. Endocrine disruptors target rat chondrogenesis *in vivo*. PPTOX III, mai 2012, Paris.

Canivenc-Lavier, M.C. CIME : Exposition continue à des mélanges de Perturbateurs Endocriniens à doses environnementales : Impact sur la Reproduction, le Développement et le Comportement Alimentaire. Présentation. Réunion PNRPE, avril 2010, Dijon.

Introduction

I. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

1. Généralités

Certaines substances xénobiotiques (étrangères à l'organisme) sont désignées sous le terme de «Perturbateurs Endocriniens» (PE) car elles interfèrent avec les systèmes hormonaux. La définition de base est celle de Weybridge (1996) et a été énoncée lors d'un colloque organisé par l'Union Européenne, l'OCDE (Organisation pour la coopération et le développement économique), l'OMS et l'industrie chimique européenne : un perturbateur endocrinien est « *une substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale* ».

Les PE sont considérés comme responsables de diverses altérations de la santé, les plus fréquentes étant des modifications du système reproducteur mâle mais aussi femelle, ainsi que le développement de cancers hormono-dépendants (sein, prostate). Cependant, à de rares exceptions près, le lien de causalité chez l'homme est insuffisamment démontré et les mécanismes d'action des PE sur la fonction de reproduction et d'autres tissus cibles demeurent assez peu connus.

Nous nous intéressons plus particulièrement aux xénestrogènes et aux anti-androgènes. Les xénestrogènes les plus fréquemment rencontrés sont des pesticides et des produits issus de l'industrie (plastiques, détergents) qui sont largement répandus dans l'environnement de par leur utilisation ou leur rejet. On rencontre également des composés provenant de plantes comme les phytestrogènes dont les isoflavones issus du soja, présentes dans l'alimentation.

Le but de notre étude est de savoir si des xénestrogènes peuvent altérer la formation du squelette, sur quels critères, et si les doses NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) (dose à laquelle aucun effet indésirable n'est observé) actuelles doivent être revues à la baisse en vue de ces effets.

1.1. La notion de mélange

L'approche toxicologique vise à évaluer des effets potentiels d'une molécule donnée sur différents systèmes biologiques *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. Un degré supplémentaire dans cette complexité apparaît avec la notion de mélanges, c'est-à-dire de cocktails de substances toxiques pouvant avoir, tant au niveau de la cellule qu'au niveau de l'organisme, voire des populations et des écosystèmes, des effets additifs ou synergiques (Christiansen et al., 2009; Hass et al., 2007; Kortenkamp, 2008, 2007).

Cette situation invite à prendre en compte les expositions concomitantes multiples dans les modèles de causalité, en les considérant de façon combinée et non pas isolée comme précédemment. Les organismes vivants sont toujours exposés à une multitude de composés de l'environnement présentant un caractère toxique. Ces composés interagissent entre eux ; leurs effets sont également sous la dépendance de caractéristiques des individus (leur génotype par exemple) et d'autres expositions comportementales. Par exemple, si un aliment est contaminé par une dizaine de PE aux cibles identiques et aux modes d'action semblables, mais à doses juste en dessous de la valeur limite tolérable, si la mesure de l'exposition est faite par composé isolé, l'exposition sera admise comme « sans danger ». En revanche, si le mode d'action des dis PE est semblable, il est possible de calculer une dose équivalente « additive » tenant compte de la dose réelle de chaque PE et de son « efficacité » à provoquer l'effet toxique. Les valeurs-seuils seront alors largement dépassées et l'aliment contaminé ne pourra plus être considéré comme réellement sain. C'est le modèle décrit notamment par Kortenkamp (Kortenkamp, 2008, 2007). Il est possible d'aller plus loin que cette première approche additive avec l'approche convergente. Des molécules de cibles et action différentes pourraient synergiser en ciblant des étapes distinctes d'un même processus biologique : nous en aurons un exemple avec les PE étudiés dans cette thèse, qui peuvent agir sur la p38-MAPK ET le récepteur des estrogènes, deux cibles différentes mais conjointes dans les effets estrogéniques sur le développement du cartilage (figure 49). En conclusion, c'est la démarche intégrative qui s'impose désormais (revue dans Inserm 2011).

1.2. La fenêtre d'exposition

L'autre idée relativement récente, est que les PE agiront de manière plus sévère ou révéleront une activité invisible aux essais classiques selon l'état physiologique de l'individu contaminé : il est intuitif qu'un adulte en parfaite santé sera plus résistant aux effets perturbateurs qu'un fœtus ou un nouveau-né, immatures sur le plan métabolique et immunologique, une femme enceinte, un malade affaibli ou un vieillard. Au niveau du fœtus, on sait que les effets de l'exposition sont dépendants du stade du développement en cours au moment de la contamination. Enfin, un enfant impubère sera beaucoup plus sensible aux PE reprotoxiques qu'un adulte ayant terminé sa puberté. C'est le concept de fenêtre d'exposition. Il est à la base de l'accident bien connu de l'exposition au diéthylstilbestrol (DES) de femmes enceintes, et donc des fœtus dans les années 60-70 (pour revues : (Kebir and Krebs, 2012; Korach and McLachlan, 1985; Lauver et al., 2005; McLachlan and Dixon, 1977; McMartin et al., 1978; Newbold, 2008; Schrager and Potter, 2004)).

La littérature récente fait état essentiellement d'effets développementaux liés à l'exposition durant la vie fœtale à des composés oestrogéniques (Birnbaum and Fenton, 2003; Den Hond and Schoeters, 2006; Hao et al., 2012; Iguchi et al., 2002; Steinhardt, 2004). On retrouve dans ces études, outre le DES, le bisphénol A (Betancourt et al., 2010; Jedeon et al., 2013) et les phthalates (Hao et al., 2013; Ivell et al., 2013). Les effets sont extrêmement variés: développementaux, reprotoxiques, morphologiques ou métaboliques, voire même psychiatriques dans le cas du DES (Kebir and Krebs, 2012).

Le bisphénol A (BPA) étudié dans notre thèse est un bon exemple de ce concept appliqué aux PE oestrogéniques. Des études de toxicité chez les rongeurs selon les protocoles de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économique) n'ont pas mis en évidence d'effets significatifs sur la reproduction des animaux et leur descendance, après une exposition au BPA dès la gestation et sur plusieurs générations. Les doses utilisées étaient comparables à une exposition environnementale chez l'homme (entre 3 µg/kg/j et 300 mg/kg/j). A l'inverse, des travaux récents réalisés sur des animaux en tenant compte des périodes d'exposition ont révélé les conséquences d'une exposition au BPA *in utero* et pendant la lactation (voir p28).

1.3. La toxicité transgénérationnelle.

Enfin, la troisième idée-force moderne fut initiée encore une fois par l'accident du DES. Des effets toxiques sont apparus non seulement chez les enfants exposés *in utero* mais aussi chez leur descendance. Cet effet transgénérationnel a été lié au phénomène d'épigenèse, à savoir la modification « hors-mutation » du génome par méthylation de bases nucléotidiques ou de protéines chromatiniques (revue dans (Kebir and Krebs, 2012; Newbold, 2004)). Désormais, les études développementales incluent ce concept et poussent les analyses au-delà de la génération F1 (exposition directe) à F2 (exposition des cellules germinales et épigenèse possible) et F3 (épigenèse certaine).

Dans notre étude, la vinclozoline est un perturbateur endocrinien dont la toxicité épigénétique est connue, comme proposée par le groupe de Skinner (voir chapitre vinclozoline page 27). Il en est de même pour le bisphénol A (voir chapitre BPA page 27).

2. Molécules étudiées

2.1. La génistéine

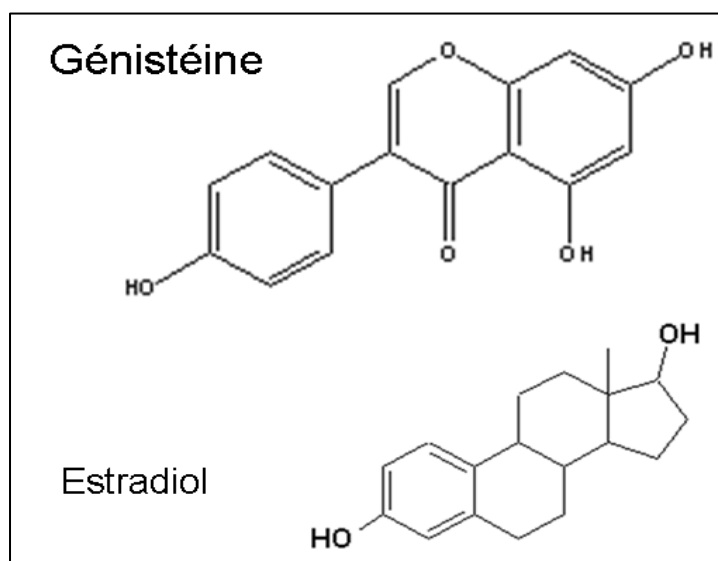


Figure 1 : Structure chimique plane de la génistéine (source : <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/fruits-et-legumes-polyphenols-et-sante-1026>) et analogie structurale avec l'estradiol.

2.1.1 Sources et données d'exposition

La génistéine, isoflavone estrogénique (Breinholt et al., 2000) surtout présente dans les légumineuses, est majoritairement apportée via les produits dérivés du soja. Selon le rapport de l'AFSSA (AFSSA, 2005), en Europe, ces apports sont modérés (<à 1mg/kg/jour) sauf pour les personnes consommant beaucoup de produits dérivés du soja (de 60 à 100 mg/kg/j) et les enfants nourris au lait de soja (jusqu'à 5mg/kg/jour) (Bennetau-Pelissero et al., 2001). Celui-ci contient environ 90 µg de génistéine/g de protéines (Irvine et al., 1998) soit près de 10 000 fois plus que le lait de vache et 2 000 fois plus que le lait d'une femme asiatique. A noter que dans le lait de femme les taux varient selon la quantité ingérée : 20 g de soja (~37 mg d'isoflavones) conduit à des taux de 50 µg/l, majoritairement des conjugués (Bluck and

Bingham, 1997). Le lait maternel constituerait alors une des sources d'exposition importante. De plus, la génistéine passe facilement la barrière placentaire par rapport à l'estradiol, et est retrouvée à des taux dix à vingt fois supérieurs à celui de l'estradiol dans le liquide amniotique au cours du second trimestre de grossesse (Foster et al., 2002) . La consommation de génistéine par la mère est donc une source importante d'exposition.

Dans l'environnement, la génistéine a aussi été retrouvée dans les eaux de surface, dans les rivières et les estuaires. Les concentrations retrouvées dépendent de l'endroit, de la proximité d'usines ou de cultures, et varient entre 300ng   2,5 g/L. Les eaux de rivières ou de fleuves peuvent donc constituer une source d'exposition pour la faune sauvage et pour l'homme (Duong et al., 2010; Lundgren and Novak, 2009). Le NOAEL chez le rat Wistar a été défini à 100 mg/kg/j, on peut donc penser que cette exposition est mineure, néanmoins elle n'est pas à négliger en raison de l'étendue de la source d'exposition et des effets additifs possibles avec d'autres PE. Nous utilisons une dose de 1/100^e du NOAEL.

2.1.2 Mécanismes d'action et effets de la génistéine

La génistéine a une affinité 100 fois moindre pour les récepteurs aux estrogènes que l'estradiol, de 10 à 20 nM (Santell et al., 1997) contre 0.1 à 0.2 nM (Watson and Muldoon, 1985). Elle montre également une très faible affinité pour les récepteurs AR et PR (Pf tscher et al., 2008; Rosenberg Zand et al., 2000; Takahashi et al., 2004) et est également capable de moduler l'expression de ces récepteurs dans plusieurs organes (Diel et al., 2006; Phrakonkham et al., 2007).

A coté de ces effets génomiques, des effets sur d'autres cibles cellulaires et sur des voies de signalisation cellulaires non génomiques sont décrits. La génistéine inhibe l'activité de certaines tyrosine kinases et topo-isomérases, modifie l'activité de certaines enzymes du métabolisme des st ro ides et a un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydant (Dixon, 2004; Phrakonkham et al., 2007). Elle peut interférer avec la voie des MAP-kinases par le biais d'une interaction avec les récepteurs (ER ) membranaires (Jeng et al., 2009; Watson et al., 2012). On notera que la génistéine provoque la synthèse extragonadique des estrogènes par induction de l'aromatase (Ye et al., 2009).

La génistéine est étudiée depuis longtemps et peut agir sur de nombreux organes. Historiquement, son effet prolifératif sur les cellules de cancer du sein est connu depuis longtemps (Martin et al., 1978), cependant cet effet dépend de la dose et des conditions de traitement *in vitro*. En outre, la génistéine a démontré des effets sur la réponse immunitaire (Sakai and Kogiso, 2008) ainsi que sur l'ob siti  et le diabète (Behloul and Wu, 2013). *In vivo*, son interférence avec le système reproducteur est démontrée, occasionnant des malformations des organes reproducteurs chez les animaux traités, ainsi qu'une baisse de la fertilité (Patisaul and Jefferson, 2010). Ainsi, la génistéine serait susceptible d'inhiber la mobilité des spermatozo ides, la capacitation et la réaction acrosomique (Tomes et al., 2004). Une exposition transplacentaire à des doses sub-NOAEL (0,1 mg/kg/jour) n'induit pas des modifications morphologiques du testicule et de l'épididyme mais modifie de manière significative l'expression d'une vingtaine de gènes au niveau de ces organes (Naciff et al., 2005). La génistéine peut donc modifier le phénotype à des doses inférieures au NOAEL actuel.

La consommation de produits à base de soja est corrélée à une diminution de risque de cancer du sein chez la femme asiatique, mais cela n'a pu être reproduit en occident par la supplémentation alimentaire (Patisaul and Jefferson, 2010).

2.1.3 Devenir de la génistéine dans l'organisme

La génistéine est essentiellement absorbée sous forme aglycone. La distribution dans l'organisme est très large. Par exemple, chez des rats exposés *per os*   100  g/g de génistéine, la génistéine est retrouvée dans l'utérus, la mamelle, l'ovaire, la prostate et le testicule (Chang et al., 2000). En dehors de la conjugaison avec un radical glucuronyl que la génistéine peut subir au niveau des entérocytes, des bio-transformations nombreuses et variées s'effectuent au niveau hépatique telles qu'hydroxylations, glucurono-conjugaisons et sulfo-conjugaisons. L'importance relative des conjugués varie en fonction des espèces animales. Seule la forme libre est active. L'élimination est principalement urinaire. La demi-vie se situe entre 6 et 8 h chez l'homme (Shelnutt et al., 2002). Chez des femmes ayant consommé du soja, les concentrations maximales en génistéine sont atteintes dans le lait 10 à 14 h après l'ingestion, en fonction des quantités de soja ingérées.

2.2. La vinclozoline

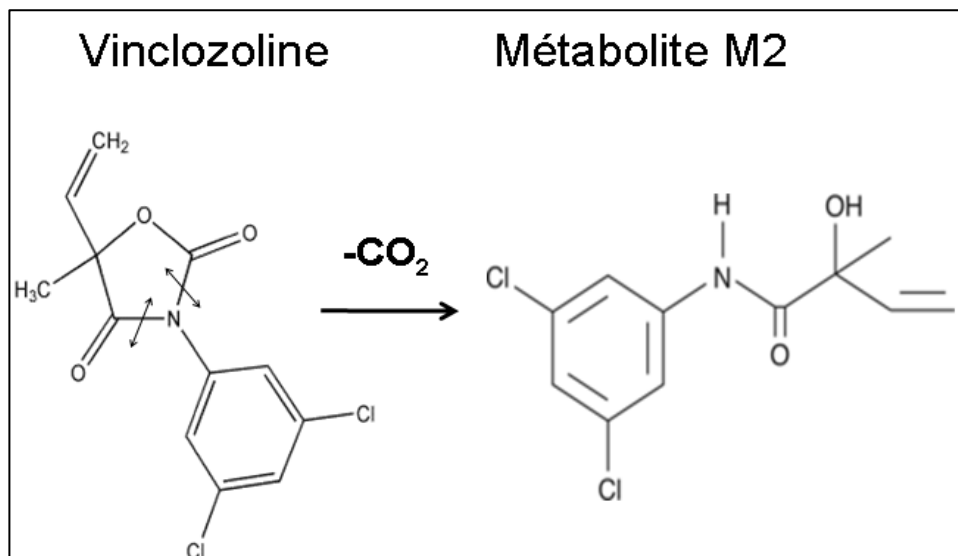


Figure 2 : Structure chimique plane de la vinclozoline et obtention du métabolite M2 par décarboxylation. (D'après (Sierra-Santoyo et al., 2012))

2.2.1 Sources et données d'exposition

La vinclozoline (Ronilan®) est un fongicide du groupe des dicarboximides très largement utilisé pour la culture de nombreux fruits et légumes depuis les années 1990. Son interdiction est récente (Décembre 2007) mais pas universelle, on ne peut écarter sa présence des denrées alimentaires via les produits d'exportations ; elle reste présente dans l'environnement ce qui justifie l'étude de son impact sur la santé. Ainsi, diverses études et rapports indiquent que les limites maximales de résidus (LMR) pour ce composé sont souvent dépassées (par exemple, (Petrelli and Mantovani, 2002)) posant le problème de l'impact sur la santé humaine. Les études sur les niveaux d'exposition notamment alimentaire, les effets en fonction de ces niveaux et les recommandations concernant les doses tolérables indiquent des effets développementaux pour des expositions courtes *in utero* à partir de 3 mg/kg/jour chez le rat (Gray et al., 2001) et une dose sans effet (NOAEL) de 12 mg/kg/jour pour la fonction de reproduction mâle pour une exposition de 3 mois chez le rat Wistar adulte (Hellwig et al., 2000). Une autre dose NOAEL de 1,2 mg/kg/jour a été proposée mais sans spécifier l'espèce

de rat utilisée (<https://federalregister.gov/a/03-7246>). L'apport journalier tolérable chez l'homme (Acceptable Daily Intake ou ADI) se situe entre 0,01 et 0,10 mg/kg selon les rapports. Nous utilisons des doses de 1/12^è et 1/1200^è du NOAEL.

2.2.2 Effets connus de la vinclozoline et mécanismes d'action

Son activité directe est faible. Son principal métabolite M2 (le plus actif sur 5 en tout), est essentiellement **anti-androgène**, mais M2, comme la vinclozoline, lie aussi les récepteurs α et β des estrogènes (ER α/β), ainsi que les récepteurs aux glucocorticoïdes et à la progestérone (Molina-Molina et al., 2006). Les propriétés antiandrogéniques de la vinclozoline ont été découvertes il y a plus de 10 ans (Kelce et al., 1997). Certains stades du développement embryonnaire des organes hormono-dépendants sont particulièrement sensibles aux effets de la vinclozoline (Gray and Ostby, 1998). La majorité des effets publiés portent sur l'appareil génital mâle. Les risques liés à une exposition à la vinclozoline sur l'appareil de reproduction femelle très peu documentés, mais la vinclozoline pourrait avoir un effet sur les cellules de la granulosa et sur la présence de kystes ovariens chez le rat, ressemblant à la maladie humaine des ovaires polykystiques (Nilsson et al., 2012). Des effets épigénétiques sont également décrits lors d'exposition à la vinclozoline à fortes doses et les anomalies seraient corrélées avec des modifications des profils de méthylation de l'ADN des cellules germinales (Anway and Skinner, 2008). Les altérations épigénétiques observées suite à une exposition à la vinclozoline touchent aussi bien les cellules germinales mâles (Guerrero-Bosagna et al., 2013) que les femelles (Nilsson et al., 2012).

Les données disponibles sur l'homme sont limitées, et on sait seulement la présence de la vinclozoline dans le sang de cordon est associée à une diminution du poids des nouveaux-nés (Wickerham et al., 2012).

2.2.3 Devenir dans l'organisme

Peu d'informations sont disponibles sur le métabolisme de la vinclozoline. La vinclozoline peut se dégrader, en fonction du pH, en deux composés appelés M1 (acide 2[[[(3,5-dichlorophenyl)carbamoyl]-oxyl]-2-méthyl-3-butenoïque) et M2 (acide N-(2-hydroxy-2-méthyl-1-oxobuten-3-yl)-3,5-dichlorophenyl-1-carbamique). Les trois composés sont des

antagonistes des récepteurs androgènes (Wong et al., 1995). Après administration par voie orale à des rats, on voit apparaître dans le plasma les métabolites M1 et dans une moindre mesure, M2 (Sierra-Santoyo et al., 2012). Ce serait le métabolite M2 qui serait le plus actif, en tant qu'anti-androgène mais aussi œstrogène.

2.3. Le bisphénol A

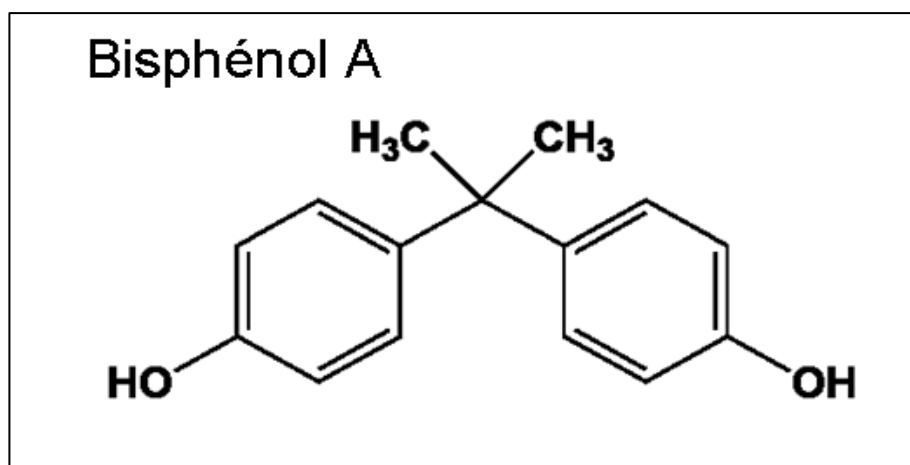


Figure 3 : Structure chimique plane du bisphenol A (source : <http://www.societechimiquedefrance.fr>).

2.3.1 Sources et données d'exposition

Le 4,4-isopropylidenediphenol, plus couramment appelé bisphénol A (ou BPA), est un composé chimique de synthèse utilisé notamment dans la fabrication industrielle des plastiques de type polycarbonates et de celle des résines epoxy. Initialement inventé en tant qu'œstrogène de synthèse, il fut abandonné pour sa faible activité. Il entre aujourd'hui dans la composition des emballages alimentaires (film, boîtes de conserves, bouteilles plastiques). Il est produit par milliards de tonnes dans le monde, et plus de 100 tonnes sont relarguées dans l'atmosphère chaque année (Vandenberg et al., 2007). Il est également présent dans les ciments dentaires (Olea et al., 1996) et de nombreuses études sont en cours sur le relargage du BPA par ces dispositifs. Le BPA a été retrouvé dans 95% des échantillons urinaires humains aux Etats-Unis (Calafat et al., 2005). Sa concentration dans le sérum humain s'échelonne entre 0.2 et 1.6 ng/ml (0.88–7.0 nM) (Sajiki et al., 1999; Takeuchi and Tsutsumi, 2002). De

plus, le BPA a été détecté dans le liquide amniotique, le sang néonatal, le placenta, le sang de cordon et le lait maternel (Richter et al., 2007).

Le BPA est principalement apporté par voie orale ; les taux varient de 40 µg/jour à 600 µg/jour selon le régime, l'âge des individus et l'état de santé dentaire. Les nourrissons y sont également exposés via le lait maternel ou des teneurs varient de 1 à 7 ng/ml, ou via les biberons en polycarbonates (Vandenberg et al., 2007). Depuis la détermination de cette limite, d'autres études montrent que le BPA peut interférer avec les systèmes endocriniens à des doses inférieures, que l'exposition soit fœtale, néonatale, périnatale ou adulte (Richter et al., 2007). Concernant le risque potentiel de ce composé, la dose LOAEL a été déterminée par l'USEPA à 50mg/kg/jour (<http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>).

Le NOAEL du BPA est encore l'objet de controverse. Les valeurs classiques de 5 mg/kg/day chez le rat Sprague Dawley (Tyl et al., 2002) et "inférieur à 1.5 mg/kg/day" chez le rat Wistar (Kubo et al., 2001) font l'objet de désaccords. Des travaux plus récents suggèrent une valeur plus proche de 2-20 µg/kg/day (Howdeshell et al., 2008). Cependant, ces études ne spécifient pas explicitement un NOAEL et ne présentent pas de courbes dose-réponse (revue dans (Arnich et al., 2011)). Nous utilisons une dose entre 1 et 1/4 du NOAEL.

2.3.2 Effets connus du BPA et mécanismes d'action

Bien que le caractère estrogénique du BPA ait été accepté, il est considéré comme un estrogénique faible puisque son affinité aux récepteurs aux estrogènes ERα/β est estimée à plus de 1000 à 10 000 fois inférieure à celle de du 17β-estradiol (EC50= 2–7x10⁻⁷M contre 1–6x10⁻¹³M pour E2) (Alonso-Magdalena et al., 2012). Le BPA se lie plus sélectivement à ERβ (Kuiper et al., 1997) et n'est pas un agoniste pur. Dans certains types cellulaires, il est proposé que le BPA ait une activité d'agoniste par sa liaison avec ERβ et une activité mixte agoniste/antagoniste par ERα (Kurosawa et al., 2002). Le bisphénol A interagit aussi avec les récepteurs nucléaires des androgènes (Krüger et al., 2008). Ses dérivés halogénés, également présents dans les aliments, sont des ligands des récepteurs thyroïdiens et entraînent des dysfonctionnements de la thyroïde chez les rongeurs (Zoeller et al., 2005). Une expertise collective récente de l'ANSES reprend la littérature et met l'accent sur ses effets avérés dans des modèles animaux sur la reproduction, les organes sexuels et leurs annexes (glande mammaires).

Des études de toxicité chez les rongeurs selon les protocoles de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économique) n'ont pas mis en évidence d'effets significatifs sur la reproduction chez les mâles, les femelles et leur descendance, après une exposition au bisphénol A dès la gestation et sur plusieurs générations, à des doses comparables à une exposition environnementale chez l'homme (entre 3 µg/kg/j et 300 mg/kg/j). Plus récemment, des travaux réalisés sur des animaux en tenant compte des périodes d'exposition ont révélé les conséquences d'une exposition au bisphénol A *in utero* et pendant la lactation. Ont été observés des effets sur l'appareil génital (hypotrophie testiculaire, hypertrophie prostatique, distance anogénitale plus courte ...), sur la production de spermatozoïdes, sur le taux des hormones mâles et sur la fertilité avec des doses de l'ordre de quelques µg/kg/j. Chez la femelle, le BPA a provoqué, par exposition gestationnelle et postnatale, une puberté précoce, des altérations de l'utérus, du vagin, de l'ovaire, de l'endomètre (doses de 0,2 à 500 µg/kg/j). Des anomalies du comportement maternel et/ou sexuel sont observées dans les deux sexes. D'autres effets sont démontrés sur le métabolisme, le système nerveux et notamment le comportement. Chez l'homme, l'ANSES rapporte globalement les mêmes effets (reproduction, métabolisme) ainsi que des effets cardiovasculaires mais reste prudente sur l'interprétation des études épidémiologiques humaines. En conclusion, il est préconisé de classer plus sévèrement le BPA comme reprotoxique (passage de la catégorie 3 à la catégorie 1A ou 1B selon les domaines d'action (ANSES, E.C. 2013)).

Enfin, le BPA est suspecté d'effets épigénétiques par de nombreux auteurs (Kundakovic and Champagne, 2011; Sekizawa, 2008; Singh and Li, 2012). Les cibles sont variées telles que le tractus génital (Prins et al., 2008; Rosenfeld, 2012; Trapphoff et al., 2013), le cerveau (Itoh et al., 2012) et le métabolisme du tissu adipeux (Vom Saal et al., 2012).

2.3.3. Devenir dans l'organisme

Le BPA est rapidement absorbé et métabolisé par glucuronidation par des enzymes présentes dans le foie et la paroi intestinale. Le BPA est alors inactivé, son métabolite glucuronidé étant dépourvu d'activité œstrogénique (Matthews et al., 2001). Le BPA circule principalement sous sa forme glucuronidée ; chez l'homme il ne subit pas de premier passage hépatique et est rapidement éliminé par les voies urinaires avec ce qui reste de la forme non

conjugée. Chez le rat la forme conjuguée subit un premier passage hépatique, ralentissant l'excrétion du BPA (Völkel et al., 2002).

En conclusion, l'exposition humaine à ces trois perturbateurs endocriniens existe depuis longtemps, surtout en ce qui concerne la génistéine et la vinclozoline. Concernant le BPA, sa présence dans l'environnement a été révélée ces dernières années et a fait l'objet de nombreuses polémiques.

II. LE CARTILAGE

Le tissu cartilagineux a comme particularité de n'être ni vascularisé, ni innervé. L'absence de vaisseaux influe sur des facteurs aussi importants que l'apport de nutriments, l'état d'hypoxie du tissu, dont le rôle est primordial lors de la chondrogenèse chez l'embryon, ainsi que chez l'adulte sur la capacité de réparation du cartilage.

Il est composé d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, qui va synthétiser la matrice extracellulaire (MEC) qui assure le maintien et l'intégrité du tissu en entier. La MEC est indispensable au bon fonctionnement du cartilage. Son rôle et sa nature diffèrent selon l'âge et la localisation anatomique du cartilage.

Il existe trois types de cartilage (Mallein-Gerin and van der Rest, 2012) (figure 4) :

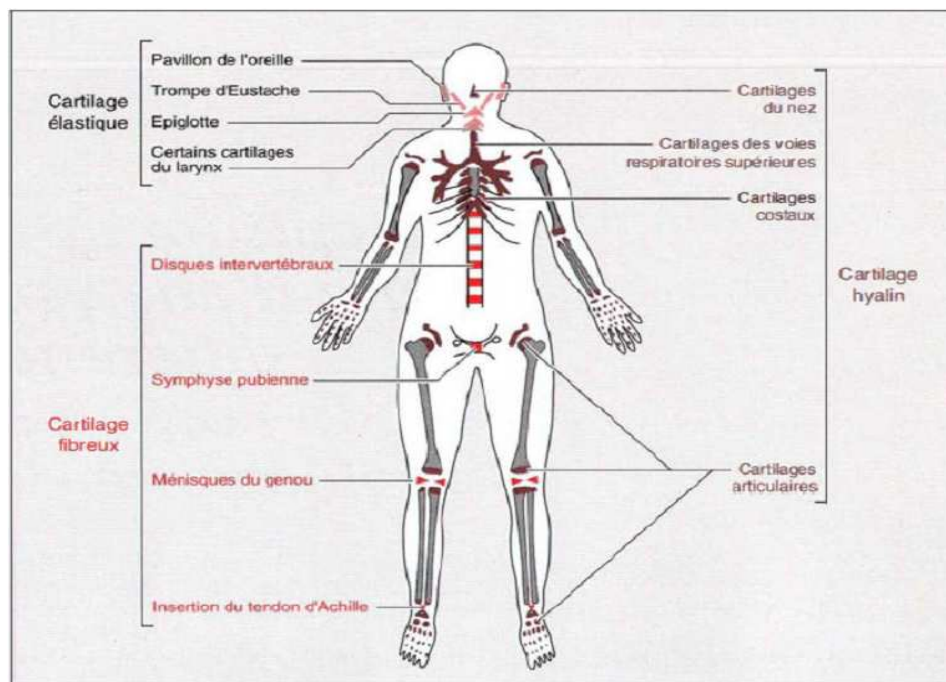


Figure 4 : Topographie des cartilages chez l'homme.

Le cartilage le plus répandu dans l'organisme est le cartilage hyalin se situe au niveau du nez, des côtés, des bronches, de la trachée et du cartilage articulaire. Le cartilage fibreux se situe au niveau des disques intervertébraux, de la symphyse pubienne, des ménisques et des insertions tendineuses. Le cartilage élastique est composé de fibres élastiques (élastine), et constitue le pavillon de l'oreille interne, la trompe d'eustache et l'épiglotte. (Mallein-Gerin and van der Rest, 2012)

- Le cartilage le plus répandu dans l'organisme est le cartilage hyalin. Sa matrice est riche en collagènes : le collagène de type 2 est majoritaire, c'est lui qui assure l'architecture et la résistance de la matrice. Deux autres type de collagènes, les collagènes de type 9 et de type 11, sont des petites molécules qui viennent étayer le collagène de type 2. Autour du collagène de type 2 viennent se greffer les molécules de protéoglycanes qui adsorbent les molécules d'eau et assurent l'élasticité du cartilage. Ce cartilage hyalin est situé au niveau du nez, des côtés, des bronches, de la trachée et du cartilage articulaire.

- Le cartilage fibreux (fibrocartilage) est composé des marqueurs chondrogéniques classiques, mais contient en plus une trame de fibres de collagène de type 1. Il se situe au niveau des disques intervertébraux, de la symphyse pubienne, des ménisques et des insertions tendineuses.

- Enfin, le cartilage élastique contient lui aussi une trame protéique particulière composée de fibres élastiques (élastine), et constitue le pavillon de l'oreille interne, la trompe d'Eustache et l'épiglotte.

Nous parlerons plus particulièrement du cartilage articulaire qui tapisse la surface des articulations, ainsi que du cartilage de croissance, aussi appelé cartilage de conjugaison, qui permet la croissance des os longs.

1. Composition du cartilage

1.1. Le chondrocyte

Les chondrocytes représentent 5 à 10% du volume tissulaire total dans le cartilage articulaire et environ 50% dans le cartilage de croissance (Corvol, 2000; Stockwell, 1978). Les chondrocytes possèdent tous les organites nécessaires à la synthèse et à la maturation des protéines indispensables à leur bon fonctionnement et à l'intégrité de leur matrice.

Le substrat énergétique du chondrocyte est le glucose. Comme le tissu n'est pas vascularisé, les chondrocytes se trouvent dans une hypoxie relative au sein de leur matrice, et la glycolyse se fait en anaérobie. Les chondrocytes sont nourris par diffusion de nutriments à

partir du liquide synovial et, de façon minoritaire, à partir de l'os sous chondral (Malinin and Ouellette, 2000).

L'hypoxie est un facteur important pour le maintien de l'intégrité du cartilage. Le facteur de transcription qui régule l'adaptation de la cellule aux variations d'oxygénation est $HIF1\alpha$. Ce facteur de transcription est indispensable à la survie et à la différenciation des chondrocytes (revue dans (Araldi and Schipani, 2010)). Il régule aussi les enzymes qui procèdent aux modifications post-traductionnelles des collagènes (Aro et al., 2012; Schipani, 2010).

1.2. La matrice extracellulaire

Il existe trois types de régions dans la matrice, appelées régions structuro-fonctionnelles de la MEC (Aigner and Stöve, 2003) illustrées sur la figure 5 .

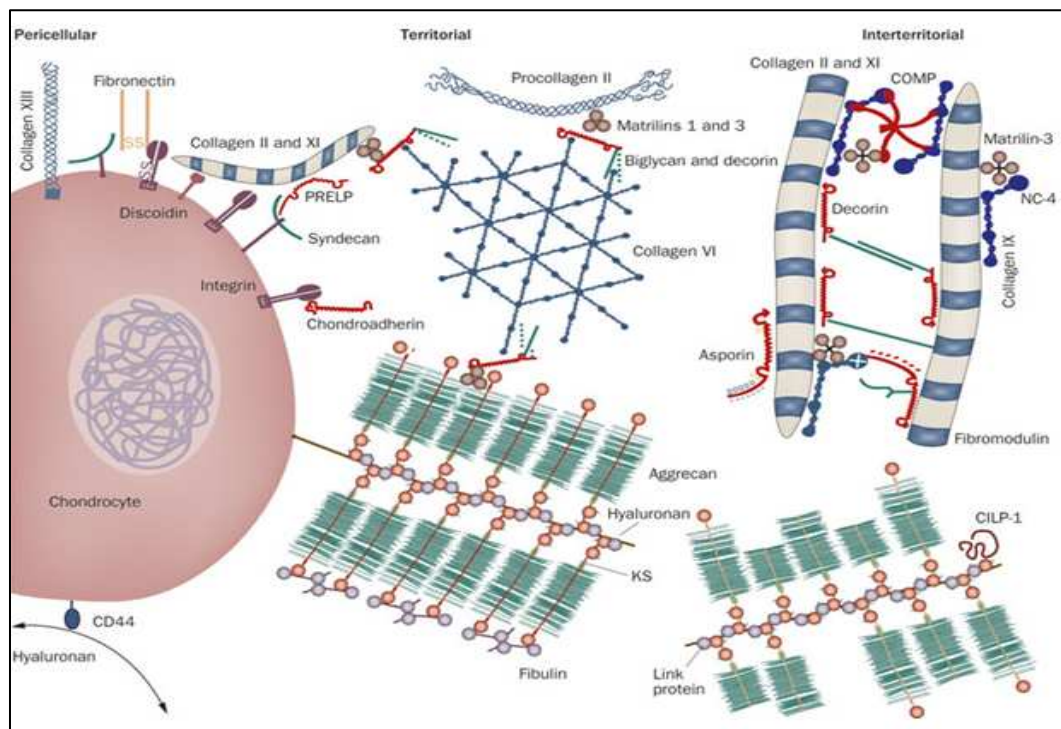


Figure 5 : Organisation de la matrice autour du chondrocyte dans le cartilage articulaire normal sain (Heinegård and Saxne, 2011). La matrice péricellulaire, localisée autour des chondrocytes contient du collagène de type 6, des protéoglycanes, de l'acide hyaluronique et des protéines non collagéniques. Le chondrocyte et la matrice péricellulaire forment le chondron. La matrice territoriale est la zone d'ancrage des macromolécules de la matrice. La matrice interterritoriale est la matrice la plus abondante. Elle est composée des fibres de collagène et les agrégats de protéoglycanes, et confère au cartilage ses propriétés de résistance et d'élasticité.

Les protéines les plus abondantes sont situées dans la zone interterritoriale : le collagène de type 2 en fibrilles (50 à 60% du poids sec), dont la quantité diminue en profondeur dans le cartilage, les protéoglycanes (35% du poids sec), dont le contenu varie de manière inverse, et les protéines non collagéniques.

1.2.1. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des macromolécules qui vont s'amarrer aux fibres de collagène et retenir l'eau au sein de la matrice. Ils contiennent de nombreuses chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) qui sont attachés à une protéine-cœur (Muir, 1978). Il existe cinq types de chaînes GAG :

- le chondroïtine sulfate (CS) ; l'héparane sulfate (HS) ; le kératane sulfate (KS) ; le dermatane sulfate (DS) ; l'acide hyaluronique qui n'est pas sulfaté.

Le nombre de chaînes de GAG est variable, de 50 jusqu'à plusieurs centaines de chaînes, et la substitution se fait par des xylosyl-transférases. L'acide hyaluronique est spécifique au sein du cartilage, il peut lier jusqu'à 250 fois son poids en protéoglycanes et la liaison entre l'acide hyaluronique et la protéine-cœur est très résistante à la dénaturation. La perte d'interaction entre les deux est réversible. Une petite protéine, la link-protéine, stabilise la liaison entre les deux.

Il existe deux types de protéoglycanes : les protéoglycanes extracellulaires de haut et de bas poids moléculaires, et des protéoglycanes membranaires.

Parmi les protéoglycanes extracellulaires de haut poids moléculaire, le plus abondant est **l'agrécan** (Hardingham and Fosang, 1992). La protéine-cœur pèse environ 250kDa. L'agrécan peut former de gros agrégats en se liant à l'acide hyaluronique qui le protège de la dégradation par les protéinases. La link-protéine est présente pour stabiliser cette liaison. Les GAG représentent 90% de la masse de l'agrécan ; le chondroïtine sulfate est majoritaire et donne à l'agrécan la capacité de se lier aux fibres de collagènes. L'agrécan peut aussi contenir des chaînes de kératane sulfate. Il est composé de 3 domaines globulaires G1, G2 et G3 qui ont une structure en feuillet β similaire à des immunoglobulines. Le domaine G1 contient un site de liaison à l'acide hyaluronique et à la link-protéine. La fonction

de G2 est inconnue. Le domaine G3, lui, semble être impliqué dans l'interaction cellule-cellule et dans la liaison de facteurs de croissance.

L'eau se lie aux protéoglycans chargés négativement au niveau des GAG et représente au moins 70% de la matrice, lui conférant ses propriétés d'élasticité et de résistance aux stress mécaniques.

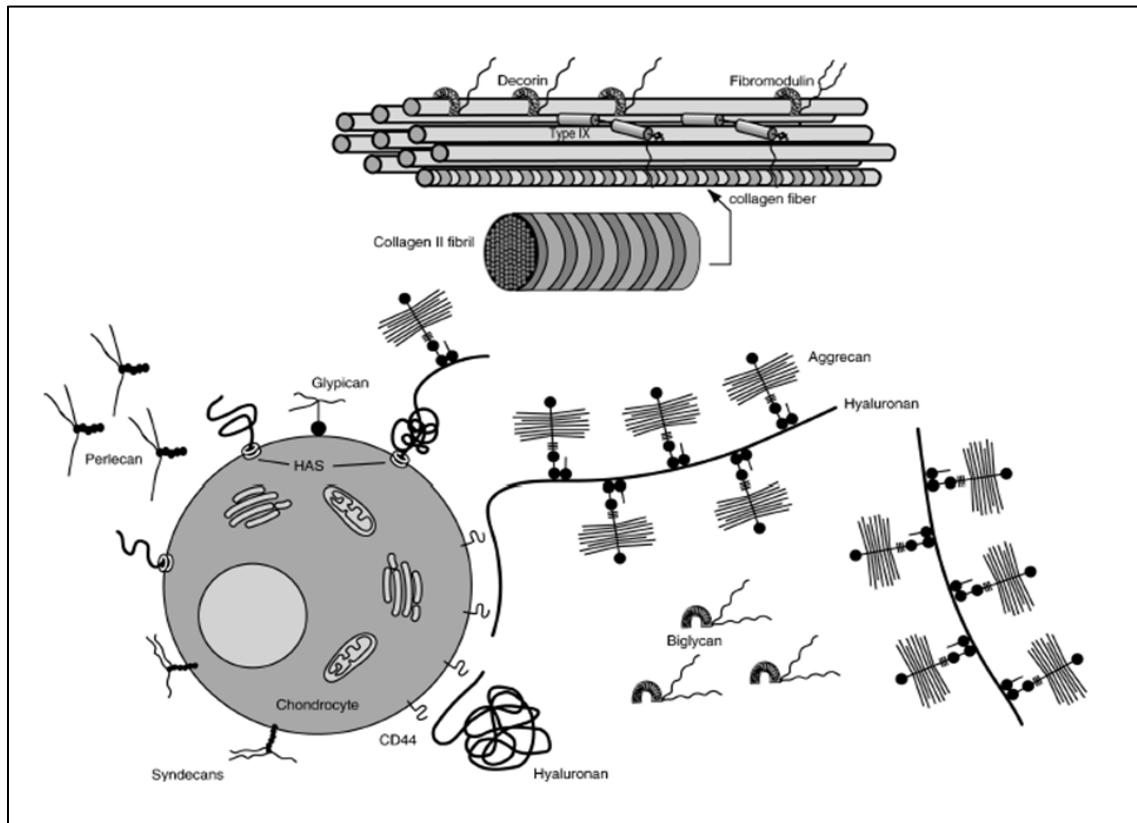


Figure 6 : Localisation des différentes catégories de protéoglycans autour du chondrocyte (en bas) et du collagène 2 (en haut). Autour du chondrocyte se situent les protéoglycans membranaires : syndécans, glypicanes. La matrice extra cellulaire contient : - des protéoglycans de haut poids moléculaire, comme l'agrécan, qui forme de gros agrégats en se liant à l'acide hyaluronique ; - des protéoglycans de bas poids moléculaire comme le biglycane, le perlecan, mais aussi la décorine et la fibromoduline qui se lient au collagène 2. Les chaînes d'héparane sulfate présentes sur tous les types de protéoglycans sont capables de lier des facteurs de croissance, comme le bFGF.

Les protéoglycanes extracellulaires de bas poids moléculaires

comptent quatre types de protéoglycanes : la décorine, le biglycan, le lumican, le perlecan, la fibromoduline. Les core-protéines ont un poids d'environ 40kDa et leur particularité provient de leur richesse en leucine. Ces protéoglycanes ont la capacité de lier les collagènes 1 et 2 afin d'en réguler le diamètre. Ils peuvent également lier d'autres molécules comme d'autres types de collagène et des facteurs de croissance comme le bFGF ou le TGF β (Roughley, 2006) .

Les protéoglycanes membranaires (parmi lesquels les syndécanes ou la thrombomoduline) sont des protéoglycanes dont la spécificité réside dans leur substitution par les chaînes GAG. De par les différents types de chaînes présentes, les protéoglycanes membranaires peuvent être modulés par des cytokines ou des facteurs de croissance. Des résidus tyrosines sur la core-protéine permettraient aussi de se lier à des tyrosines-kinases et activer des cascades de signalisation.

1.2.2. Le collagène

Chez les hauts eucaryotes dont l'homme, la famille des collagènes compte 26 gènes au moins, codant pour 13 types de collagènes. Ils sont abondants dans les tissus squelettiques (os, cartilage, ligaments, tendons), et appartiennent généralement à la matrice extracellulaire. Les collagènes sont tous constitués de triples hélices polypeptidiques trimériques avec des domaines répétés Gly-X-Y (X et Y étant des résidus quelconques) riches en proline. Leur remaniement intervient entre autres dans les processus physiologiques de développement embryonnaire, mais également dans des processus pathologiques à l'âge adulte (dysplasies, arthrose, ostéoporose). C'est pourquoi il est très important de connaître leur structure, leur assemblage mais aussi leur dégradation et leur métabolisme.

a. Structure des collagènes

Selon les travaux de Gelse (Gelse et al., 2003), les collagènes se répartissent en trois grands types en fonction de leur structure protéique : les collagènes fibrillaires, les collagènes microfibrillaires, et les FACIT (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices). Les collagènes sont synthétisés sous forme de procollagènes, dont la structure est illustrée figure 7.

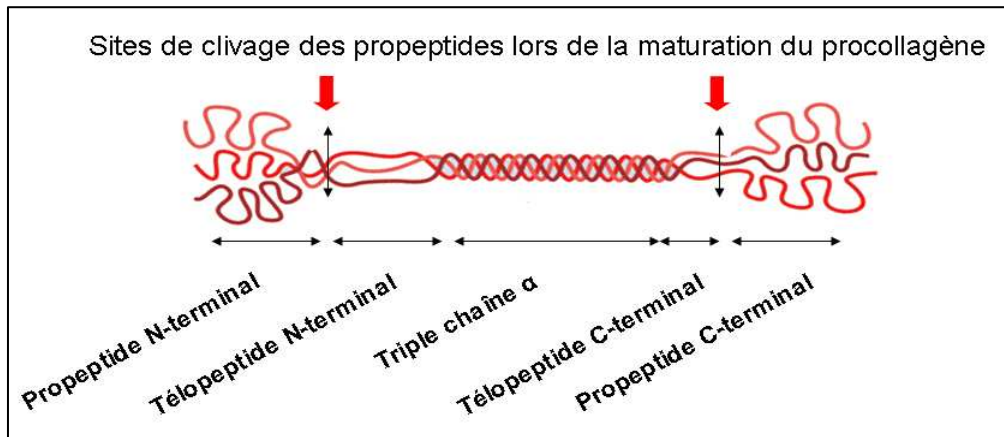


Figure 7 : Schéma d'une molécule de procollagène (*D'après (Gelse et al., 2003).*). Les collagènes sont synthétisés sous forme de procollagènes qui sont composés : - d'un domaine N-propeptide qui entre en jeu dans la régulation du diamètre des fibrilles, suivi du site de clivage puis du télopeptide N-terminal. - La triple hélice dont les chaînes alpha sont assemblées en homo- ou hétérotrimères, supporte la majeure partie de la fonction de la molécule de collagène au sein de la matrice à laquelle elles appartiennent. – Enfin le télopeptide C-terminal et la zone de clivage puis le domaine C-propeptide qui a un rôle dans l'initiation de la formation de la triple hélice. Les télopeptides sont des domaines non hélicaux situés entre les propeptides et les triples chaînes, à chaque extrémité. Ils sont impliqués dans les liaisons des collagènes avec d'autres molécules de la matrice.

b. La biosynthèse des collagènes.

La biosynthèse des collagènes se passe en plusieurs étapes (Figure 5):

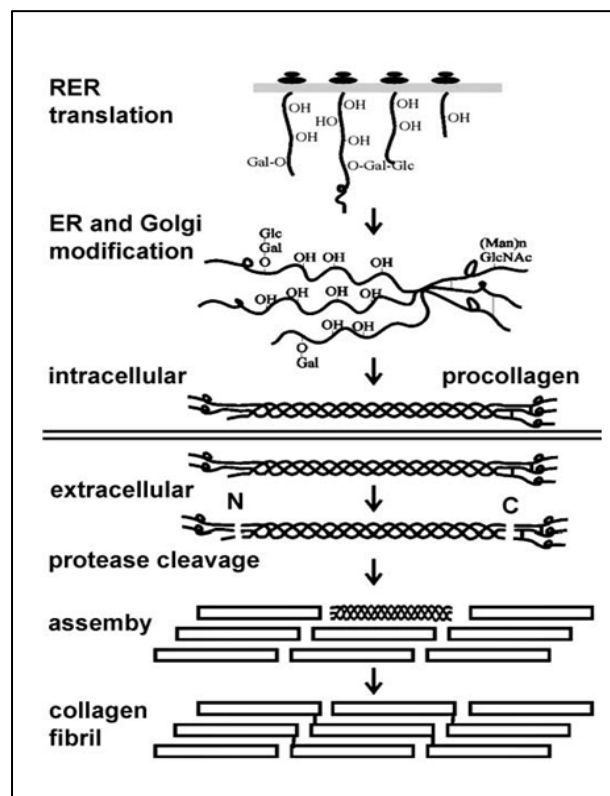


Figure 8 : Les différentes étapes de la biosynthèse du collagène (Source : <http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=File:Collagen-synthesis.jpg>)

- Leur transcription s'effectue de manière classique : un ou plusieurs gènes vont coder pour l'ensemble d'une molécule de préprocollagène comprenant chacun des domaines cités plus haut. Les transcrits sont exportés sous forme d'ARN de transfert en dehors du noyau. Pour l'ensemble des collagènes, il existe de nombreux transcrits alternatifs.

- La traduction se fait dans le reticulum endoplasmique rugueux en préprocollagène qui, après clivage enzymatique, donne le procollagène.

- Une suite de modifications post-traductionnelles du procollagène a lieu ensuite dans le Golgi : les résidus lysine et proline sont hydroxylés par les prolyl-3-hydroxylase, prolyl-4-hydroxylase et la lysyl-2-hydroxylase. Cette réaction utilise des ions ferreux comme cofacteurs, du 2-oxo-glutarate, de l'oxygène et de l'acide ascorbique. Environ 50% des résidus proline ont un groupement hydroxyle en position 4 (cette caractéristique dépend de l'espèce), qui est indispensable pour la formation de liaisons hydroxyles intramoléculaire et intermoléculaire entre les molécules de collagènes. Cela confère une grande stabilité thermique, permettant de conserver l'intégrité du monomère et de stabiliser la conformation de la fibrille de collagène. En ce qui concerne les résidus d'hydroxylysine, ils sont glycosylés et galactosylés et permettent la formation de liaisons intermoléculaires stables.

- L'assemblage des chaînes de monomères de propeptide se fait dans la région en C-terminal. La formation des triples hélices est précédée par l'alignement des domaines C-terminaux des trois chaînes. L'isomérase disulfide (PDI) est impliquée dans la formation de ponts disulfure intra et intermoléculaire des molécules de procollagène.

- Production de collagène mature et sécrétion : Après l'assemblage des molécules de procollagène les molécules de triple hélice sont empaquetées dans des vésicules de sécrétion et relarguées dans l'espace extracellulaire. Au moment de ce relargage, des peptidases présentes à la membrane coupent les propeptides des deux extrémités, permettant la libération de collagène mature et son assemblage en fibrilles.

Si la synthèse des collagènes est similaire pour tous les collagènes, la longueur de ces fibrilles et la fonction qui en découle peut varier.

Parmi les différents types de collagènes, nous ne citerons que ceux qui sont majoritairement présents dans le cartilage.

Les collagènes fibrillaires :

- Le collagène de type 2 (COL2) est un homotrimère. Il est le composant spécifique et prédominant du cartilage hyalin (80% du contenu en collagène). Toutefois, il n'est pas totalement restreint au cartilage adulte puisqu'on le trouve aussi dans le corps vitré, dans l'épithélium cornéen, dans le noyau pulpeux du disque intervertébral mais également dans l'embryon, au niveau de la notochorde et lors des transitions épithélio-mésenchymateuses. De par sa présence dans la matrice extracellulaire, et son interaction avec les protéoglycanes qui permet l'hydratation de cette matrice, il confère au cartilage sa résistance aux différentes forces et pressions auxquelles il est soumis. COL2 est donc un élément majeur conférant au tissu son élasticité et sa capacité de déformation.

- Le collagène de type 11 (COL11) est un hétérotrimère de trois chaînes alpha différentes. Le COL11 est important car il est codistribué dans le cartilage articulaire et le corps vitré avec le collagène de type 2.

Les FACIT:

- Le collagène 9 (COL9) fait partie des FACIT, dont le domaine collagénique est interrompu par des domaines courts non hélicaux. Le COL9 est, comme le COL11, codistribué avec le COL2 dans le cartilage articulaire et le corps vitré. C'est un hétérotrimère qui est localisé périodiquement sur la surface des fibrilles de COL2 dans une direction antisens à celle des fibrilles. COL9 et COL11 servent d'amarrage à certaines protéines sur le COL2. Ils sont aussi impliqués dans la régulation du diamètre des fibrilles de COL2, qui font en moyenne 30 nm de diamètre (entre 15 et 50nm).

- Le collagène de type 16 (COL16) est associé à une fraction de fibrille du COL2 dans le cartilage hyalin.

Les collagènes microfibrillaires:

- Le collagène de type 10 (COL10) fait partie des collagènes à courte chaîne. Le COL10 est un composant caractéristique du cartilage hypertrophique dans la plaque de croissance fœtale et juvénile. C'est un homotrimère avec un domaine C-terminal long et un domaine N-terminal court. Il est impliqué dans le processus de calcification de la partie hypertrophique la plus proche de l'apoptose.

c. Dégradation des collagènes

Les triples hélices natives sont résistantes à des enzymes comme la pepsine, la trypsine ou la chymotrypsine. Pour altérer l'intégrité de ces triples hélices, il faut des métalloprotéases particulières. Dans le cartilage, plusieurs types de métalloprotéases sont présents :

- Métalloprotéase 1 (MMP1) ou collagénase A : c'est une collagénase interstitielle qui est exprimée dans une grande variété de cellules. Elle est impliquée dans le remodelage tissulaire.
- Métalloprotéase 13 (MMP13) ou collagénase C : la MMP13 est exprimée par les chondrocytes hypertrophiques, les ostéoblastes et les ostéoclastes, et est impliquée spécifiquement dans le remodelage des cartilages et des os.
- Métalloprotéase 3 (MMP3) ou stromélysine : cette MMP peut cliver la molécule de COL2 dans son intégralité (Fukui et al 2002) ;
- Métalloprotéase 14 (MMP14) : cette MMP peut jouer le rôle d'une N-protéase et d'une télopeptidase. Elle est liée à la membrane et pourrait jouer un rôle dans le processus de maturation du procollagène.
- Métalloprotéase 9 (MMP9) : cette MMP peut cliver les propeptides.

d. Le collagène de type 2 (COL2)

C'est, avec l'agrécan, l'un des deux marqueurs phénotypique du cartilage. Il est exprimé dès la période embryonnaire où il forme un important réseau matriciel au niveau des bourgeons de membres et du rachis vertébral. Il contribue ainsi à la formation du patron cartilagineux de l'embryon, avant que celui-ci ne soit remplacé par le tissu osseux selon le processus d'ossification endochondrale. Le COL2 est aussi exprimé dans l'œil : pendant l'embryogenèse, on le rencontre dans l'épithélium primaire de la cornée, dans le cristallin, la rétine et la sclère. A l'âge adulte son expression dans l'oeil se restreint au corps vitré sous une forme soluble, dont nous verrons plus tard qu'il s'agit d'une isoforme immature de COL2 dont la fonction n'est pas connue. Enfin, il assure la résistance du cartilage articulaire à toutes les forces auxquelles il est soumis.

- COL2 est codé par un gène unique, *Col2a1*₍₃₎

Le gène du COL2 humain a été complètement identifié en 1985 (Cheah et al., 1985; Sangiorgi et al., 1985). Il fait 30kb dans sa totalité. Le gène de la souris a été étudié plus en

détail. On constate 89,1% d'homologie entre les séquences exoniques de la souris et de l'homme, et 95,2% sur la totalité du gène, ce qui permet d'extrapoler ce qui est connu dans la souris à ce qui peut se passer chez l'humain. Le gène du COL2 murin a été étudié dans son intégralité en 1991 par l'équipe de Metsäranta (Metsäranta et al., 1991). Il est composé de 54 exons et fait 28,9 kb du site de transcription jusqu'au site de polyadénylation (figure 9). Comme pour tous les collagènes fibrillaires, sa structure exonique est très conservée, surtout en ce qui concerne la triple hélice et le domaine C-terminal. La partie N-propeptide de la souris, quant à elle, comporte 88 à 90% d'identité par rapport à la séquence humaine.

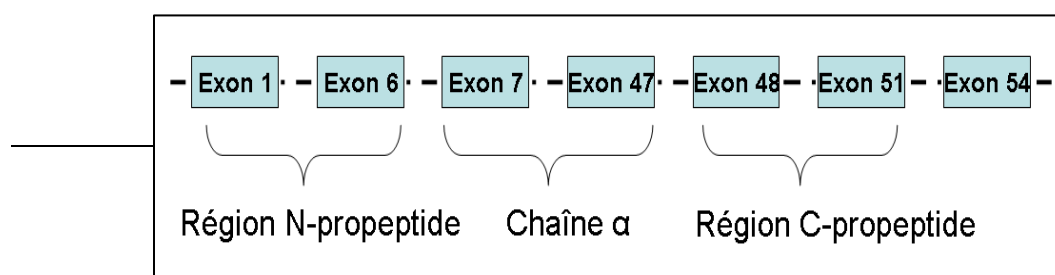


Figure 9 : Séquence codante du gène de procollagène 2 α 1 de souris (D'après (Nah et al., 2001)). Seuls les exons 1 à 51 sont codants. La région N-propeptide est codée par les exons 1 à 6 ; la région de l'hélice alpha est codée par les exons 7 à 47 ; enfin, la région C-propeptide est codée par les exons 48 à 51. Les trois derniers exons ne sont pas codants.

- Epissage alternatif du gène *Col2a1* : Il existe au sein du gène *Col2a1* un exon cassette, l'exon 2. La transcription du gène peut donner lieu à deux isoformes, le COL2A, comprenant l'exon 2, et le COL2B, qui ne l'inclut pas. L'épissage alternatif a été mis en évidence en 1990 par Ryan (Ryan et al., 1990). Ces deux isoformes du messager sont traduites en deux protéines différentes. L'inclusion de l'exon 2 donne naissance à un domaine supplémentaire au sein du propeptide N-terminal, qui obtient alors un domaine riche en cystéine. Dans le cartilage articulaire mature de l'adulte sain normal, seule l'isoforme COL2B est exprimée et traduite (figure10).

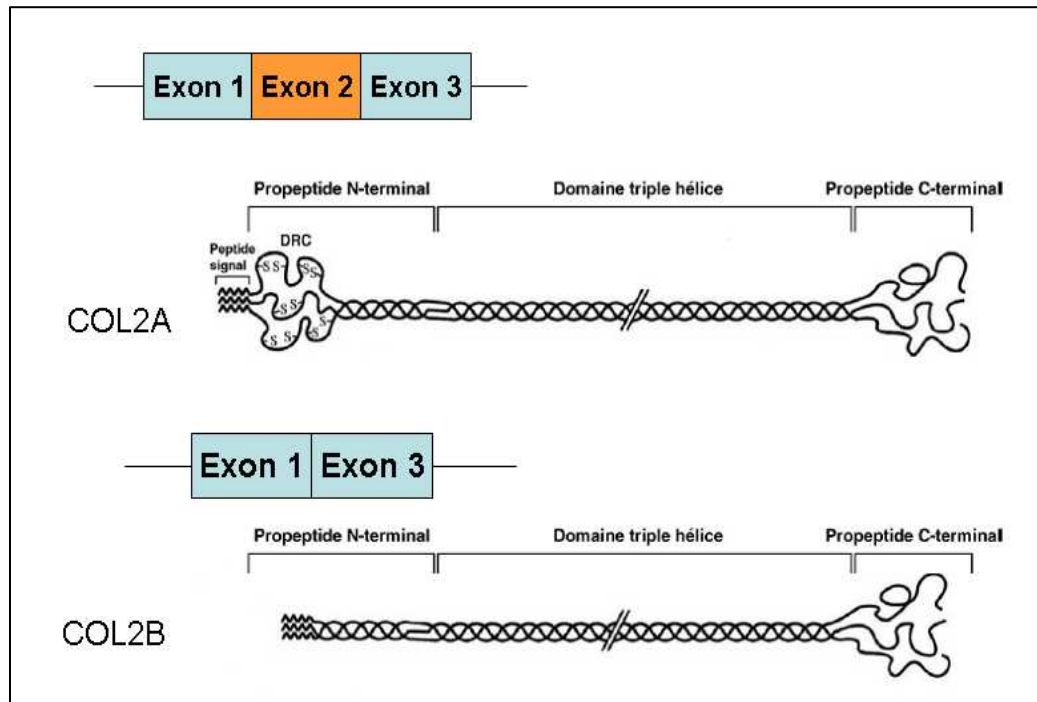


Figure 10 : L'existence d'un épissage alternatif au sein du gène du *Col2a1* peut donner naissance à deux isoformes COL2A et COL2B, transcrites et traduites. Le COL2A, par l'inclusion de l'exon 2, a un domaine riche en cystéine (DRC) supplémentaire par rapport à COL2B. D'après (Salentey et al., 2009).

- La majorité des mutations affectant le COL2 se trouve au niveau de la séquence de la chaîne alpha et de la partie C-terminale. Ces mutations pour la plupart perturbent la croissance des os longs (dysplasies spondylo-épiphysaires, achondrogenèses...) mais elles peuvent aussi favoriser une dégénérescence des surfaces articulaires (syndrome de Stickler ...).

Expression des isoformes COL2A et COL2B *in vivo* :

- Expression chez l'embryon : stades précoces

Au cours du développement, chez l'embryon humain, comme chez la souris, l'expression de collagène de type 2 est très précoce, mais essentiellement représentée par l'expression de l'isoforme COL2A, sans expression de COL2B.

COL2A est exprimé dans les cellules mésenchymateuses dès les premiers processus de migration et de prolifération de ces cellules, en particulier dans les structures qui donneront plus tard les éléments du futur squelette osseux. Ainsi, COL2A est exprimé dans le sclérotome qui va donner les vertèbres, le mésenchyme crânien et le mésenchyme des bourgeons de membres.

La signification et le rôle de l'expression de COL2A à ce stade du développement ne sont pas connus. Il a été montré que le COL2A joue un rôle important dans la dorsalisation de l'embryon de Xénope (Larraín et al., 2000). Il peut se lier à la BMP4 grâce à son domaine riche en cystéines, tout comme à la chordine, un morphogène, et induire la dorsalisation de l'embryon. Plus tard, il a été montré que l'invalidation même partielle du COL2A chez la souris conduit à de très importantes malformations de l'ensemble de la face (mandibule, septum nasal, encéphale). L'impact du COL2A sur la formation de l'ensemble de la tête de l'embryon semble lié à l'expression de Shh (Sonic Hedgehog), autre morphogène impliqué dans la dorsalisation de l'embryon (Leung et al., 2010). Bien que cette fois l'activité de COL2A ne passe pas par une liaison au récepteur des BMP, il est évident que le COL2A joue un rôle important dans le développement précoce de l'embryon en interagissant avec un ensemble de morphogènes et de facteurs de croissance en présence.

Toutefois, COL2A est aussi exprimé dans des structures tissulaires autres que celles du futur squelette osseux, comme par exemple dans le mésonephros, la notochorde, l'épimyocarde de l'oreillette, le pharynx et le larynx.....Son rôle est inconnu.

- Expression chez l'embryon : Différenciation chondrogénique, formation du patron cartilagineux, ossification endochondrale.

Au cours des stades suivants de développement, nous nous sommes focalisés sur l'expression de COL2A et COL2B au niveau 1) de la chondrogenèse (différenciation

préchondrogénique puis chondrogénique des cellules mésenchymateuses) qui aboutit à la formation du patron cartilagineux du futur squelette, puis 2) au cours du processus de maturation des chondrocytes du cartilage et de croissance (prolifération, hypertrophie et dégénérescence des chondrocytes) qui donne lieu au processus d'ossification endochondrale des os longs (remplacement du patron cartilagineux par du tissu osseux).

Peu de travaux ont été réalisés, mais l'étude de Lui et al. (Lui et al., 1995) chez l'embryon humain par hybridation *in situ* à différentes étapes de l'embryogenèse, ainsi qu'une étude similaire chez l'embryon de souris par Sandell et al. (Sandell et al., 1994, 1991), permettent de dégager les points suivants :

1. Lors de **l'induction chondrogénique**, l'expression de COL2A est observée dans les cellules mésenchymateuses non différenciées, dans les cellules préchondrogéniques en voie de différenciation et un peu seulement dans les chondrocytes en prolifération. A ce stade, COL2B est minoritaire, il n'est exprimé que dans les chondrocytes différenciés.

2. Lorsque le **processus de maturation des chondrocytes** survient, la structure typique d'un cartilage de croissance se forme avec la séquence de cellules quiescentes, prolifératives, et hypertrophiques. L'expression de COL2A est essentiellement observée au niveau des chondrocytes quiescents, puis elle diminue progressivement au cours du processus de maturation cellulaire pour disparaître dans les chondrocytes hypertrophiques. Le phénomène inverse s'effectue pour l'expression de COL2B qui augmente progressivement. L'expression de COL2A est donc transitoire au cours de la différenciation chondrogénique et de la maturation cellulaire des chondrocytes dans le cartilage de croissance embryonnaire et s'accompagne d'un switch vers l'expression de COL2B. Fait intéressant, il semble que la protéine COL2A soit piégée dans des fibrilles de collagènes formé par le COL2B en péricellulaire ainsi qu'en interterritorial, dans la matrice, comme cela a été observé dans les bourgeons de membres chez l'embryon de poulet de 7 jours (Nah et al., 2001).

3. Le **processus d'ossification endochondrale** a lieu après pénétration vasculaire des patrons cartilagineux. Les chondrocytes hypertrophiques entrent alors en différenciation terminale et meurent par apoptose, permettant le remplacement du

cartilage par le tissu osseux. Au niveau du processus de différenciation terminale, les données de la littérature concernant l'expression de COL2A ne sont pas claires. Pour certains il y aurait réexpression de COL2A dans les zones profondes du cartilage, pour d'autres non.

A ce stade chaque patron cartilagineux est entouré d'une membrane, le périchondre ou périoste, qui contient des cellules progénitrices chondrocytaires et ostéocytaires. La protéine COL2A est fortement exprimée dans cette membrane.

4. Le processus d'ossification endochondrale se poursuit ensuite chez le fœtus, puis après la naissance jusqu'à la puberté. Chez le fœtus, on note alors une diminution progressive de l'expression de COL2A dans toutes les structures chondrogéniques. A 24 semaines chez l'homme l'expression de COL2A ne représente plus que 6% du COL2 total.

En conclusion : Au cours du développement embryonnaire, COL2A est exprimée dans les cellules mésenchymateuses multipotentes et plus particulièrement les cellules préchondrogéniques et préosteogéniques (périchondre) alors qu'aucune expression de COL2B n'est observée. COL2A est exprimé en tant qu'espèce moléculaire majoritaire dans les étapes précoces de différenciation chondrogénique, puis diminue au profit de l'expression de COL2B au cours du processus de maturation et d'hypertrophie des chondrocytes de cartilage de croissance. Seul COL2B est exprimé dans le cartilage adulte normal.

1.2.3. Les protéines non collagéniques

Les protéines non collagéniques sont les protéines les moins bien connues de la matrice extracellulaire. Des molécules comme la fibronectine interviennent dans l'organisation de la matrice extracellulaire ; d'autres, comme la matrix Gla protéine (MGP), régulent la calcification de la matrice (Stheneur et al., 2003).

2. Le renouvellement des protéines matricielles

Le renouvellement des protéines matricielles est très lent ; si l'on prend en compte les deux protéines majoritaires, il est de l'ordre de quelques années pour l'agrécan et de l'ordre de 100 ans pour le collagène de type 2 (Knudson and Knudson, 2001; Maroudas et al., 1998). Ce renouvellement est le résultat entre la synthèse et la dégradation de la matrice qui est toujours en équilibre.

De nombreuses enzymes interviennent dans cet équilibre lors de la dégradation de la matrice. Elles se divisent en deux groupes, les métalloprotéases (MMPs, matrix metalloproteinases) et les agrécanases (ADAMTS, a disintegrin and a metalloproteinase with thrombospondin motif).

Les ADAMTs peuvent cliver les protéoglycanes. Elles contiennent un domaine qui se lie aux intégrines et qui empêche les interactions cellule-cellule.

Les MMPs peuvent cliver les collagènes. Pour ce faire, elles ont la capacité de se lier aux héparane-sulfates des protéoglycanes. Certaines cytokines comme l'IL1 β et le TNF α peuvent induire leur synthèse. Elles sont synthétisées sous formes de proenzymes qui doivent être activées. Cette activation peut passer par d'autres enzymes comme des sérines protéases ou même des métalloprotéases elles-mêmes. Au sein du cartilage articulaire, la MMP13 peut être induite par IL1 β dans des conditions inflammatoires et cliver le collagène de type 2.

Enfin, il existe des inhibiteurs spécifiques des protéases, les TIMPS, qui se lient aux MMPs pour les inhiber (Cawston and Young, 2010; Murphy and Nagase, 2008).

Il est indispensable de connaître le déroulement de la formation du squelette et de la mise en place du cartilage pour étudier les effets éventuels de molécules environnementales sur le cartilage et/ou sur le développement du squelette.

3. Le développement du squelette osseux

Le squelette des os longs (les os des membres, les vertèbres, les petits os des oreilles, ainsi que la cage thoracique et la mâchoire inférieure) ainsi que les os du crâne dérivent du

tissu mésenchymateux embryonnaire par deux processus d'ossification différents. Les premiers subissent d'abord un double processus, morphogénique et chondrogénique, qui donne lieu à un patron entièrement cartilagineux du futur squelette. Ce patron cartilagineux sera remplacé progressivement par du tissu osseux lors de la croissance en longueur des os : c'est l'ossification endochondrale. Au niveau des os du crâne, le tissu mésenchymateux se différencie directement en tissu osseux ; c'est l'ossification membranaire. Ces différentes étapes ainsi que les principaux régulateurs de leur mise en place sont schématisés sur la figure 11 (Day et al., 2005).

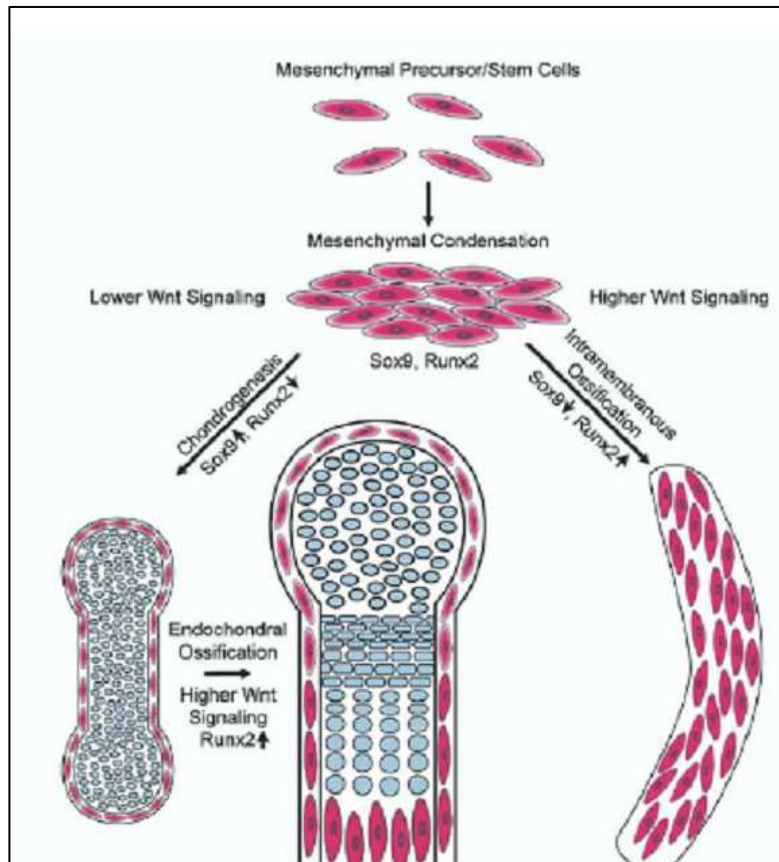


Figure 11 : Représentation schématique des différentes étapes menant à la construction du squelette sous l'influence des facteurs de transcription Sox9 et Runx2 (Day et al., 2005).

Les cellules mésenchymateuses à l'origine du squelette proviennent de différentes régions de l'embryon : les cellules de la crête neurale et le mésoderme latéral pour le squelette cranio-facial ; le mésoderme latéral uniquement pour les membres ; enfin, le mésoderme latéral, le mésoderme para-axial et la notochorde pour la colonne vertébrale et la cage thoracique (Lefebvre and Bhattaram, 2010). La formation des bourgeons de membre commence dès la quatrième semaine de gestation. Ces cellules mésenchymateuses sont souvent appelées ostéochondroprogéniteurs, car les cellules engendrées par la suite vont être de deux types : ostéoblastes et chondrocytes, qui vont donner respectivement une partie du tissu osseux, et le cartilage. Elles peuvent néanmoins donner d'autres types cellulaires ou rester mésenchymateuses. Nous nous intéresserons surtout aux origines et devenir des cellules qui vont donner des chondrocytes.

3.1. Facteurs de transcription impliqués dans l'expression des marqueurs chondrogéniques.

De nombreux facteurs, pas tous connus, sont nécessaires pour définir le destin de ces cellules. Une famille de protéines est particulièrement connue pour endosser ce rôle dans la direction de la différenciation chondrogénique :

- la famille Sox (SRY-related HMG box). Ces protéines sont liées à la détermination du sexe de l'embryon et à la présence d'une HMG-box qui représente un domaine de liaison à l'ADN. Les protéines de cette famille ont un rôle important dans de nombreux tissus dans l'embryon et sont codées par 39 gènes. Etant donné qu'elles peuvent se lier à l'ADN cela leur donne, entre autres propriétés, celle de facteur de transcription. Parmi elles, la protéine Sox9 est impliquée dans le développement en règle générale. Elle est exprimée dans de nombreux organes lors de la morphogenèse (crête neurale (Haldin and LaBonne, 2010), progéniteurs des valves cardiaques (Chakraborty et al., 2010), du foie, du pancréas exocrine, de l'intestin (Furuyama et al., 2011) et joue un rôle primordial dans le développement des testicules de l'embryon mâle (Barrionuevo and Scherer, 2010). Ainsi, des mutations au sein de la séquence

de Sox9 peuvent engendrer une inversion du sexe des patients XY, transformant les mâles en femelles (Foster et al., 1994; Meyer et al., 1997; Wagner et al., 1994).

- Le facteur Sox9, est le facteur majeur de différenciation chondrogénique. Les mêmes mutations qui engendrent une inversion du sexe occasionnent également un syndrome appelé dysplasie campomélique. Il en résulte une absence de synthèse de cartilage qui donne une hypoplasie des os longs, entraînant une mort à la naissance en raison d'insuffisance respiratoire (la cage thoracique, tout comme la totalité du squelette, ne peut pas se développer normalement). D'autres expériences d'invalidation chez la souris ont montré que l'absence d'expression de Sox9 entraîne l'absence de développement du squelette (Bi et al., 1999).

Enfin, sur le plan moléculaire, il a été montré que Sox9, avec le recrutement de deux cofacteurs L-Sox5 et Sox6, est indispensable à la transcription des marqueurs phénotypiques spécifiques du cartilage comme le collagène de type 2 (Lefebvre et al., 1998; Zhao et al., 1997; G. Zhou et al., 1998), l'agrécan (Han and Lefebvre, 2008), et également les collagènes de type 9 et 11 (Bridgewater et al., 1998).

Sox9 est donc le facteur de transcription indispensable à la chondrogenèse ; et il est exprimé tout au long de la différenciation chondrogénique et contrôle sa maturation et sa mort (Dy et al., 2012).

- Un autre facteur de transcription, le facteur Runx2, joue un rôle dans la différenciation terminale des chondrocytes, et est régulé par Sox9. Il favorise la formation de l'os endochondrale suite à la mort des chondrocytes.

3.2. La maturation du cartilage de croissance et l'ossification endochondrale.

Après la phase de condensation mésenchymateuse, la différenciation chondrogénique survient et les chondrocytes envahissent totalement chaque élément du futur squelette sous la forme d'un patron uniquement cartilagineux. Pour chaque membre et chaque os, les ébauches cartilagineuses apparaissent selon une séquence proximo-distale et le processus d'ossification survient selon un schéma extrêmement précis.

3.2.1. Pénétration vasculaire et formation de la plaque de croissance épiphysaire.

Chaque futur os du squelette se trouve d'abord sous la forme d'un patron uniquement cartilagineux qui grandit, illustré dans la figure 12. Après pénétration vasculaire, les chondrocytes subissent un processus de maturation cellulaire qui les conduit à l'apoptose : c'est la naissance du cartilage dit « de croissance ». Le tissu osseux néoformé va remplacer progressivement le tissu cartilagineux.

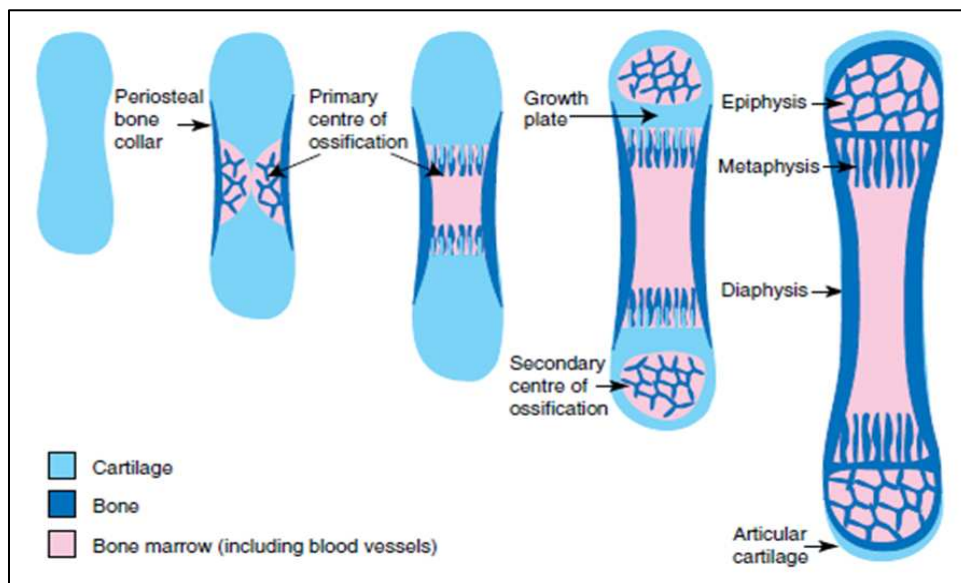


Figure 12: Les différentes étapes de l'ossification endochondrale (Mackie et al., 2011). Au départ chaque futur os du squelette se trouve sous la forme d'un patron uniquement cartilagineux. Les cellules de cartilage forment le « cartilage de croissance », ou cartilage métaphysaire, siège d'un processus de prolifération puis de maturation des chondrocytes, qui les conduit vers la mort apoptotique. L'ossification se fait à partir de points d'ossification différents. En règle générale, il existe un point d'ossification primitif diaphysaire et deux points secondaires épiphysaires. Ces points sont le siège d'une phase de pénétration vasculaire. Autour des vaisseaux apparaissent les premières cellules ostéoblastiques qui vont déposer le tissu ostéoïde sur les cadavres des chondrocytes. Les centres d'ossification secondaires vont délimiter le cartilage articulaire à la surface de l'épiphyse, et le cartilage de croissance, entre les deux centres d'ossification.

Certaines cellules vont rester en périphérie et former une enveloppe cartilagineuse : le périchondre, composé de deux couches : une couche interne contenant des cellules de réserve pour la chondrogenèse, et une couche externe qui va donner le périoste et contenir la formation osseuse (Kronenberg, 2007).

A l'intérieur de cette enveloppe, les chondrocytes s'organisent de manière très précise, sous la forme d'une plaque de croissance, contenant le cartilage de croissance (cartilage de conjugaison) qui persistera jusqu'à la fin de la puberté, et duquel il ne subsistera que le cartilage articulaire. La plaque de croissance sera remplacée petit à petit par le squelette osseux définitif. C'est pendant la période de croissance que les chondrocytes sont métaboliquement le plus actifs par comparaison avec le cartilage articulaire adulte, où les chondrocytes ne prolifèrent pas et ont une activité homéostasique.

3.2.2. Le cartilage de croissance, siège d'un processus de maturation cellulaire des chondrocytes.

Au niveau des os longs, la plaque de croissance se trouve dans la partie métaphysaire et délimite l'épiphyse des os. Le cartilage est divisé en zones successives correspondant à la progression des stades de maturation cellulaire des chondrocytes. La figure 13 illustre les différentes zones du cartilage de croissance et les facteurs de contrôle de ce processus.

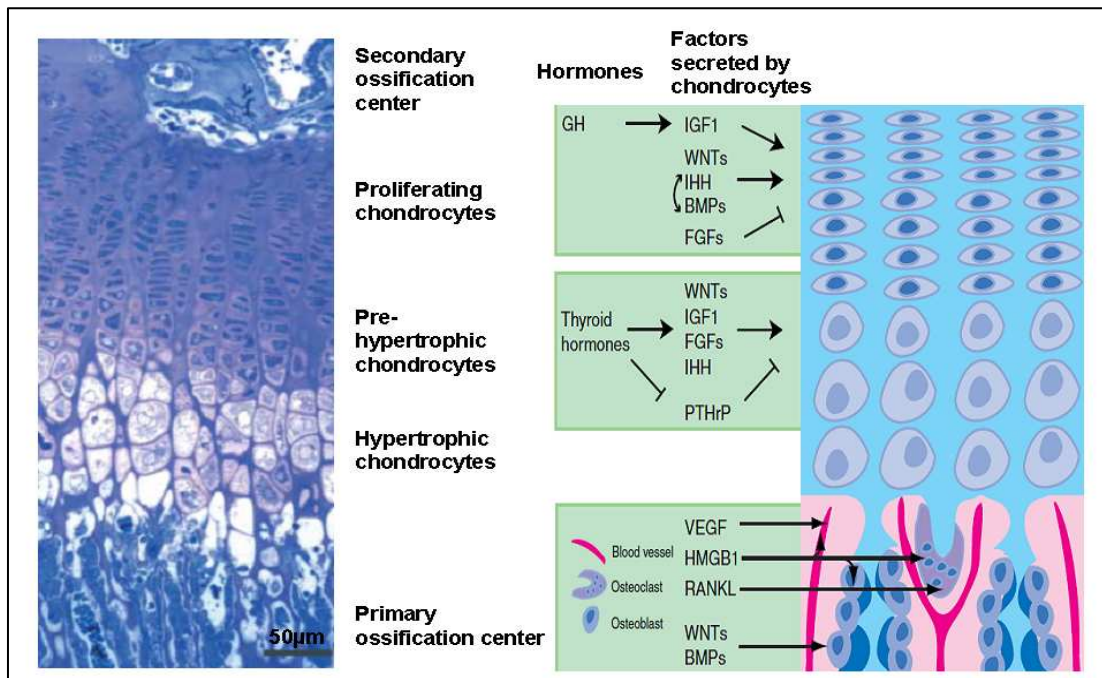


Figure 13: Les différentes étapes de la différenciation chondrogénique au sein de la plaque de croissance, et les facteurs qui la contrôlent (D'après (Mackie *et al.*, 2011)). A gauche une image histologique de cartilage de croissance hyalin. A l'extrême droite un schéma représentatif des différentes étapes de maturation cellulaire des chondrocytes. Au centre (sur fond vert) la liste des facteurs qui contrôlent la maturation des chondrocytes.

De l'épiphyse à la métaphyse (le plus près de la partie osseuse), on note :

- la zone de réserve, ou quiescente. Les chondrocytes sont peu actifs et sont organisés en une couche parallèle à la surface. Le renouvellement de cette zone est assuré par le recrutement de chondroblastes d'origine péri-chondrale.
- La zone proliférative : les chondrocytes se divisent rapidement et forment des colonnes qui prolifèrent perpendiculairement à la surface épiphysaire. Ils synthétisent de la matrice qui contient les protéines types du phénotype chondrocytaire (COL2, 9, 11, agrécan).
- La zone hypertrophique : les chondrocytes s'élargissent, s'arrondissent et produisent une grande quantité de matrice, mais elle est d'un autre type. La matrice de COL2 et d'agrécan est remplacée progressivement par du COL10.

En parallèle pour favoriser le remplacement de matrice de COL2 par le COL10, et plus tard par la matrice osseuse, les chondrocytes sécrètent aussi des protéines de dégradation comme les agrécanases et les MMPs 1, 3 et 13. Quand elles se rapprochent de l'apoptose les cellules produisent aussi de la phosphatase alcaline qui favorise la minéralisation ultérieure de la matrice. Elles commencent également à exprimer le facteur angiogénique VEGF (vascular endothelial growth factor), qui va favoriser la pénétration des vaisseaux sanguins. Enfin les chondrocytes meurent et la matrice est le siège d'un processus de micro-calcification, qui sera suivi de la formation de la matrice osseuse (ostéoblastes) et de son remodelage (ostéoclastes).

La zone osseuse nouvellement synthétisée qui en résulte est appelée centre d'ossification primaire. Elle débute au centre de la diaphyse et progresse en direction des épiphyses. Les centres d'ossification secondaire apparaissent ensuite, au niveau des épiphyses, à la suite de la pénétration d'autres vaisseaux sanguins. Ces centres d'ossification secondaires vont délimiter le cartilage articulaire, à la surface de l'épiphyse, et le cartilage de croissance, entre les deux centres d'ossification. Le cartilage de croissance disparaît vers l'âge de 20 ans, à la fusion des deux centres d'ossification épiphysaires et diaphysaires. Il ne reste donc chez l'adulte que le cartilage articulaire.

3.2.3. Facteurs intervenant dans le contrôle de la croissance

a. Facteurs de croissance

Bien que non vascularisé, le cartilage est capable de stocker au sein de sa matrice des facteurs de croissance produits par les chondrocytes et d'autres cellules environnantes (périoste), et qui vont agir de manière autocrine ou paracrine.

Parmi eux, le facteur Ihh (Indian Hedgehog) qui interagit avec un récepteur spécifique, Patched-1 (Ptc-1) (Kronenberg, 2007). Ihh coordine la prolifération des chondrocytes et accélère la conversion des cellules de réserve en cellules prolifératives. Ihh stimule la sécrétion de PTHrP dans les cellules périarticulaires. PTHrP effectue un rétrocontrôle sur Ihh et régule la prolifération et la mise en place de la différenciation terminale. Enfin, Ihh induit l'ossification du périchondre.

Les BMPs (bone morphogenic protein) jouent un rôle à plusieurs étapes de la chondrogenèse. Elles représentent un important pool régulateur de la signalisation induite par Ihh et s'opposent aux effets des FGFs. Elles modulent la prolifération et l'apoptose des chondrocytes, et sont requises pour l'aboutissement de la différenciation terminale (Pogue and Lyons, 2006; Yoon et al., 2006).

Les médiateurs de la voie Wnt/ β caténine exercent un contrôle négatif sur la différenciation des chondroprogéniteurs alors qu'ils favorisent la différenciation ostéogénique. Plus tardivement, ils permettent le passage des chondrocytes prolifératifs au stade hypertrophique (Day et al., 2005; Pogue and Lyons, 2006; Tamamura et al., 2005).

Tout au long du processus d'ossification endochondrale et lors du maintien de l'homéostasie du cartilage articulaire, la matrice est soumise à des remaniements qui ont déjà été évoqués grâce aux métalloprotéases.

A l'âge adulte, lors de pathologies concernant le cartilage articulaire comme l'arthrose, les métalloprotéases peuvent être induites par des cytokines comme l'IL1 β et le TNF α . Le remaniement pathologique du cartilage s'accompagne alors de phénomènes inflammatoires.

b. Facteurs sériques, rôle des hormones.

Bien que les vaisseaux ne pénètrent jamais dans le cartilage de croissance, leur arrivée au niveau diaphysaire et aux deux extrémités épiphysaires change l'environnement des chondrocytes. Les facteurs apportés par le sang, comme les hormones et les nutriments, peuvent pénétrer par diffusion et atteindre les cellules. **C'est un point important dans notre recherche car les polluants environnementaux peuvent atteindre le cartilage par cette voie.**

En effet, de nombreuses hormones influent le développement du cartilage. Tout d'abord, l'hormone de croissance (GH, growth hormone) stimule la prolifération des chondrocytes par l'intermédiaire de l'IGF1 (Insuline-like growth factor 1) (Demarquay et al., 1990; Hunziker et al., 1994). Les hormones thyroïdiennes agissent sur la maturation des chondrocytes, par l'intermédiaire de la voie Wnt/ β caténine (Mackie et al., 2011). La vitamine D, indispensable à la fixation du calcium sur les os, joue également un rôle dans la maturation des chondrocytes et dans la vascularisation du cartilage calcifié (Boyan et al., 2001; Dean et al., 2001; Garabedian et al., 1978).

Enfin, **les stéroïdes sexuels** ont un rôle essentiel dans le développement du cartilage. La suppression des estrogènes par ovariectomie entraîne des troubles de développement du cartilage (Strickland and Sprinz, 1973). Au moment de la puberté, les stéroïdes et surtout les estrogènes stimulent la sécrétion de GH, et donc la prolifération des chondrocytes (Grumbach, 2000). La plaque de croissance du cartilage contient les récepteurs nécessaires à l'action des hormones estrogéniques (Dayani et al., 1988) : les récepteurs aux estrogènes ER α/β sont présents majoritairement dans la zone quiescente et la zone proliférative chez l'homme comme chez la femme (Morishima et al., 1995; Smith et al., 1994).

Il n'y a pas de récepteurs aux androgènes dans le cartilage. Les effets des androgènes sur la fermeture du cartilage chez l'homme, passent par leur transformation métabolique en estrogènes via l'aromatase (Oz et al., 2001; Vanderschueren et al., 2004). En revanche ces récepteurs sont présents dans l'os, le périoste et surtout dans les muscles. L'imprégnation des androgènes chez l'homme permettrait de renforcer la formation d'os périostéal en comparaison de la femme, diminuant le risque de fracture (Duan et al., 2001). Les effets des estrogènes sur le cartilage ont depuis longtemps été identifiés au sein du laboratoire : le 17- β -estradiol a un effet stimulant sur la synthèse de protéoglycanes (Corvol et al., 1987) et des effets chondroprotecteurs en présence de cytokines inflammatoires (Richette et al., 2007). Les effets des estrogènes sont dépendants de la concentration sérique : à l'approche de la puberté, cette dernière augmente, entraînant la fusion des centres d'ossification primaire et secondaire. Des données plus récentes indiquent que les estrogènes induisent la sénescence de la plaque de croissance, causant l'épuisement du pool de chondrocytes et la fusion de la plaque de croissance épiphysaire (Börjesson et al., 2013). **Il est donc logique de penser que les dérivés des stéroïdes comme les perturbateurs endocriniens peuvent avoir un effet sur le cartilage.** Mais cela reste à démontrer.

III. CARTILAGE ARTICULAIRE ADULTE PATHOLOGIQUE : L'ARTHROSE.

Les pathologies qui touchent le cartilage (arthrose et polyarthrite) atteignent plus de 25% de la population dans les pays développés et sont la cause majeure des handicaps physiques de la population adulte de plus de 40 ans. L'arthrose représente plus de la moitié de ces pathologies et le nombre de personnes atteintes va en augmentant avec le vieillissement de la population.

L'arthrose est une maladie dégénérative, multifactorielle qui induit des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques du cartilage et entraîne la perte d'homéostasie du cartilage. Cette pathologie, longtemps considérée comme une maladie du cartilage, touche en fait l'ensemble de l'articulation, et inclut une dégradation du cartilage articulaire, ainsi qu'une inflammation synoviale, une dégénération des ligaments et un épaissement de l'os sous-chondral avec néoformation d'excroissances osseuses appelées ostéophytes (Goldring, 2012).

1. Dégradation du cartilage

L'érosion de la surface du cartilage arthrosique résulte d'une fragmentation de la matrice, et plus précisément une dégradation du collagène de type 2 et de l'agrécan, ce qui entraîne une fragilisation du tissu.

De fait, l'arthrose se caractérise par un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice. La dégradation est accrue par une stimulation de l'expression des MMPs et des ADAMTs par des cytokines comme IL-1 β et le TNF α , qui sont produits par les chondrocytes et les cellules de la synoviale. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de NO intervient aussi dans la réaction inflammatoire observée au sein du cartilage et de la synoviale.

De nombreuses voies de signalisation cellulaires sont activées par les cytokines IL-1 β et TNF α . Entre autres, la voie NF κ B et la voie des MAPK sont impliquées dans l'expression des MMPs et des ADAMTs (Goldring and Marcu, 2009).

1.1 Causes de l'arthrose

La ou les causes de l'arthrose ne sont pas connues. A ce jour l'arthrose ne bénéficie que de traitements symptomatiques (anti-douleurs, anti-inflammatoires, rééducation...). La prévention de l'aggravation ou de l'accélération de la dégradation du cartilage est capitale pour reculer la mise en place d'une prothèse chirurgicale, seul traitement curatif.

1.2. Facteurs de risque de l'arthrose

De nombreux facteurs de risques sont liés à l'apparition de l'arthrose :

1) les facteurs généraux comme l'âge, le sexe, l'obésité, les mutations génétiques.

L'arthrose n'est pas une maladie génétique mais certaines mutations altèrent la synthèse de la matrice et favorisent l'apparition de l'arthrose. Ainsi de nombreuses pathologies congénitales sont liées à des mutations du gène de collagène 2 (Hall, 2002; Kannu et al., 2012). La majorité des mutations se situe au niveau de la séquence codant pour la chaîne alpha ou pour le propeptide C-terminal et beaucoup sont dominantes. Ces mutations donnent souvent des codons stop qui engendrent une protéine raccourcie et non fonctionnelle comme les mutations à l'origine d'une dysplasie spondyloépiphysaire, touchant les extrémités des os longs et les vertèbres ou le syndrome de Stickler de type 1 qui donne un tableau clinique variable (hypermobilité des articulations, anomalies de la face dont la formation d'une fente palatine, perte importante de l'audition due à des problèmes des petits os de l'oreille, détachement de la rétine (Banerjee et al., 2007). Ces syndromes favorisent tous la survenue précoce de l'arthrose (Hall, 2002).

Quand des mutations affectent plus précisément l'exon 2, on observe des effets systémiques moins importants, avec des arthropathies mineures et moins fréquentes (Donoso et al., 2003; Richards et al., 2000).

2) les facteurs locaux sont aussi des éléments importants dans la survenue et/ou l'évolution de l'arthrose, comme par exemple les lésions mécaniques dues à une blessure ou

une charge répétée au niveau de l'articulation, des activités sportives intenses, des anomalies anatomiques...

Les lésions du cartilage ne se réparent pas.

Dans un premier temps, un processus de réparation s'amorce, caractérisé par la reprise de la prolifération des chondrocytes (images classiques de clusters cellulaires) ainsi que l'augmentation de l'expression de COL2, mais cette matrice néoformée n'est pas fonctionnelle (Goldring and Marcu, 2009). Les chondrocytes subissent un changement de phénotype et expriment des marqueurs de progéniteurs mésenchymateux comme Notch 1 (Grogan et al., 2009) ou **l'isoforme immature COL2A du collagène 2, normalement absente du cartilage adulte sain.**

2. Expression de COL2A chez l'adulte et implication dans l'arthrose.

En effet, à l'âge adulte, COL2A n'est plus exprimé dans le cartilage normal chez l'homme. On le retrouve dans les fibrilles de collagène du corps vitré chez la souris adulte (Savontaus et al., 1997), chez le bœuf (Reardon et al., 2000) et chez le chien dans la rétine (Du et al., 1998).

En revanche, la protéine COL2A a été observée dans le cartilage arthrosique, plus précisément dans le fibrocartilage et le cartilage secondaire des ostéophytes (Aigner et al., 1999). Le rôle et la fonction de COL2A ne sont pas connus. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant un rôle éventuel dans l'arthrose :

- La persistance de COL2A dans le cartilage de croissance pourrait avoir un retentissement tardif sur la formation de l'os.

Selon une expérience menée par Lewis en 2012 (Lewis et al., 2012), sur des souris knock-in pour le COL2A, la persistance de l'expression de cette isoforme n'affecterait pas directement la croissance du cartilage. En revanche, l'os formé présente une masse trabéculaire métaphysaire plus basse chez les animaux knock-in que chez les animaux normaux.

- COL2A pourrait être un marqueur de tentative de réparation du cartilage avec reprise du processus d'ossification endochondrale.

Dans un modèle de souris transgénique arthrosique, COL2A est exprimé dans le cartilage articulaire dès les étapes précoces de dégénérescence et plus particulièrement dans les surfaces qui supportent les charges (Salminen et al., 2001). Trois constats ont pu être faits dans ce modèle :

1. Aux marges des lésions dégénératives, certains chondrocytes semblent produire de la matrice, avec un fort marquage de Sox9, de COL2A, et de protéoglycanes ;
2. D'autres zones sont complètement inactives et ne sont pas du tout marquées, ni pour Sox9 ni pour COL2A ;
3. COL2A est détectée dans les zones profondes, où le cartilage est calcifié.

- COL2A pourrait être un marqueur de dédifférenciation chondrocytaire.

In vitro, Gouttenoire et al apportent des arguments expérimentaux qui suggèrent que COL2A pourrait être un marqueur de dédifférenciation chondrogénique (Gouttenoire et al., 2010). Ils montrent que des chondrocytes embryonnaires de souris en culture, expriment des quantités importantes de COL2A après amplification des chondrocytes par passages successifs. Cette augmentation de COL2A s'accompagne d'une diminution progressive de COL2B alors que des marqueurs de dédifférenciation, comme le collagène de type 1, sont induits et fortement exprimés. Un résultat similaire est observé lorsque les chondrocytes sont mis en présence d'un facteur de dédifférenciation, comme le TGF β . Ce facteur augmente COL2A, alors qu'en présence de BMP2, facteur de différenciation, COL2A diminue (Gouttenoire et al., 2010; Valcourt et al., 2003). COL2A étant capable de lier des facteurs de croissance par son extrémité N-terminale riche en cystéine, pourrait jouer le rôle de présentateur de ces facteurs aux cellules environnantes, et moduler ainsi le niveau de différenciation des chondrocytes (Zhu et al., 1999).

- COL2A, marqueur de gravité de l'arthrose.

Le dosage du propeptide aminoterminal du procollagène de type 2A (PIIANP) dans le sang ou le liquide synovial de sujets atteints d'arthrose plus ou moins avancée, pourrait donc être un marqueur de gravité de ces pathologies (Rousseau et al., 2004). Les données d'une étude effectuée sur 5 ans, sur une cohorte de patients atteints d'arthrose du genou, sont en faveur de cette hypothèse. Elle met en évidence une augmentation du niveau sérique et urinaire de PIIANP au cours de l'évolution de la pathologie. Cette augmentation est d'autant

plus importante que la maladie progresse. Et plus le niveau sérique et urinaire de PIIANP est élevé au début de l'étude, plus le patient a de risques d'avoir une arthrose grave (Sharif et al., 2007).

3. Régulation de l'expression de COL2A

Peu d'éléments sont connus sur la régulation de l'expression de COL2A.

En ce qui concerne le transcrit alternatif, la présence d'éléments cis-introniques au niveau des introns 1 et 2 (encadrant donc l'exon 2) semble très importante pour l'épissage alternatif (Nishiyama et al., 2003). A ce jour, une seule protéine est candidate pour la régulation de l'épissage alternatif de COL2A : la protéine TIA-1 (McAlinden et al., 2007). Cette protéine, impliquée dans d'autres épissages alternatifs, pourrait se lier à l'ARN messager, permettant ainsi l'inclusion de l'exon 2 en stabilisant son site d'épissage. Elle pourrait également stabiliser le transcrit en lui-même, empêchant ou limitant sa dégradation.

En ce qui concerne la protéine, cette dernière pourrait être processée par différentes métalloprotéases (MMP3, 9, 13, 14) de manière non spécifique par rapport à COL2B. Seule la MMP7 serait susceptible de cliver la molécule de procollagène au niveau du domaine riche en cystéines spécifiquement codé par l'exon 2, ayant ainsi la possibilité de libérer des facteurs de croissance potentiellement lié à ce domaine (Fukui et al., 2002).

En conclusion, COL2A est une molécule majoritairement impliquée dans le développement de l'embryon dans son ensemble : On la retrouve dans de nombreux organes à différents temps de la morphogenèse. COL2A est présent dans toutes les structures préchondrogéniques de l'embryon, et il est certain qu'il joue un rôle même si celui-ci est encore inconnu, de par sa possible interaction avec des facteurs de croissance, sur le développement du squelette. Il est absent du cartilage adulte normal. Il est fortement exprimé dans le cartilage arthrosique et les taux de propeptide circulant sont proportionnels au degré de gravité de l'arthrose.

On peut émettre l'hypothèse que son affinité à lier les facteurs de croissance pourrait le conduire à séquestrer puis libérer un nombre important de facteurs parmi lesquels des facteurs tels que bFGF, susceptibles d'accélérer le processus de dégradation.

IV. LES FACTEURS FGFs.

Les FGFs ou Fibroblast Growth Factor sont des peptides dont les rôles au sein de l'organisme sont variés. Les premiers membres connus de la famille FGF ont été caractérisés à partir des années 1970. Ils ont été tout d'abord isolés à partir de l'hypophyse bovine par Gospodarowicz (Gospodarowicz, 1975).

Depuis, vingt-deux FGF ont été identifiés chez les mammifères (Matsuo and Kimura-Yoshida, 2013). Ils proviennent tous d'un ancêtre commun.

Selon Itoh et Ornitz (Itoh and Ornitz, 2011), il est possible de classer les FGFs des mammifères en trois catégories selon leur mode de fonctionnement :

- les FGF paracrines ou « canoniques » : ils sont localisés hors de la cellule, soit dans la matrice extracellulaire soit à la surface des cellules.
- Les FGF endocrines ou « hormonaux » qui sont localisés dans le cytoplasme.
- Les FGF intracrines qui sont situés hors de la cellule comme les FGF paracrines.

Il a été démontré depuis longtemps qu'ils jouent un rôle dans la prolifération cellulaire (Gospodarowicz and Moran, 1975), l'angiogenèse (Presta et al., 2005; Schweigerer et al., 1987), la différenciation, la migration et la survie cellulaires.

Certains FGFs, dont le FGF2 ou bFGF ainsi que leurs récepteurs (R-FGFs) sont particulièrement impliqués dans la formation du squelette axial et des os longs.

1. Structure protéique des FGFs

Tous les bFGF comportent une protéine-coeur de 120 à 140 acides aminés (Dorey and Amaya, 2010). Les sous-familles diffèrent par la présence ou non de certains signaux détaillés dans la figure 14.

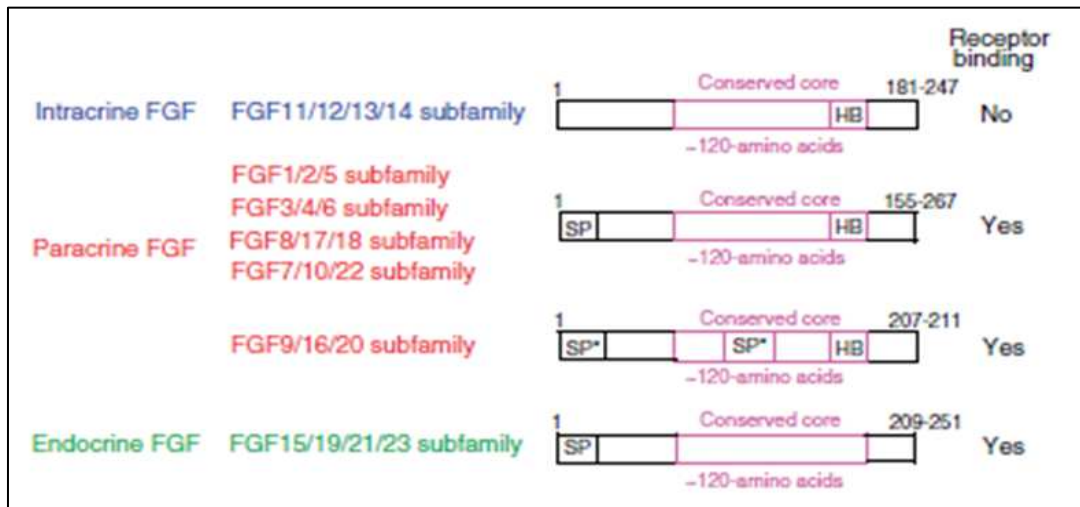


Figure 14 : Tableau des sous-familles des FGFs et leurs séquences protéiques (selon (Itoh and Ornitz, 2011)). Tous les FGFs comportent une protéine-cœur (en rose), un signal de sécrétion pouvant être clivé (SP) ou non (SP*), ainsi que la présence ou non d'un site de liaison à l'héparine. Les FGFs intracrines ne possèdent pas de site de liaison à un récepteur et les FGFs endocrines n'ont pas de site de liaison à l'héparine.

2. Les récepteurs aux FGFs (FGF-R)

Les rôles des FGFs sont variés au sein de l'organisme. L'absence de pathologie grave observée lors de l'inactivation de certains FGFs provient vraisemblablement de leur nombre élevé et de leur redondance (Okada-Ban et al., 2000). En revanche, de nombreuses pathologies impliquant les récepteurs aux FGFs, (FGF-Rs), ont été caractérisées. Les FGF-Rs sont au nombre de 4 ; ils sont codés par 4 gènes *Fgfr* 1 à 4 et appartiennent à une famille de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase.

La structure des FGFRs peut se découper en trois parties : un domaine extracellulaire, composés de 3 domaines similaires à des immunoglobulines, permettant la fixation des ligands ; un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire, comprenant une région tyrosine kinase, qui va permettre l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire après phosphorylation (figure 15).

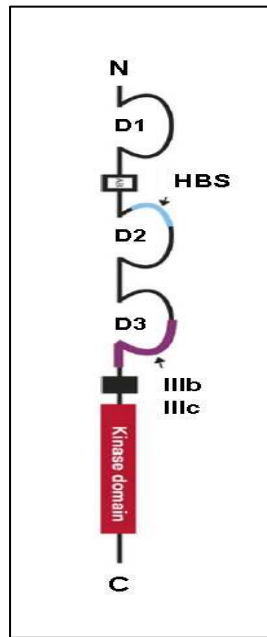


Figure 15 : Représentation schématique d'un monomère de récepteur FGFR. N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale ; D1, D2 et D3 sont les domaines immunoglobuline-like appartenant à la partie extracellulaire ; HBS correspond à la portion pouvant se lier à l'héparine/héparane sulfate ; IIIb/IIIc figure la partie où se produit l'épissage alternatif. (D'après (Mohammadi M. et al., 2005)).

Trois de ces récepteurs (FGFR1 à 3) sont soumis à des épissages alternatifs donnant naissance à de nombreuses isoformes, ayant des fonctions différentes (Blanquet, 2012). L'épissage alternatif touche le domaine extracellulaire. Il existe alors pour chaque FGFR une isoforme b (épithéliale) et une isoforme c (mésenchymateuse) (Yeh et al., 2003). Les isoformes de chaque récepteur sont tissu-spécifique et elles ont des affinités variables en fonction des ligands, ajoutant encore une diversité de réponse aux différents FGFs.

3. Voies de signalisation des FGFs

De nombreuses voies cellulaires peuvent être activées suite à la dimérisation des FGFRs et à la phosphorylation de leur domaine tyrosine-kinase : les voies de signalisation de PKC δ , NF κ B, Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt. Ces différentes voies de signalisation peuvent converser entre elles et ont des rôles très variés, expliquant le pléiotropisme des FGFs. La voie qui nous intéresse le plus est la voie Ras/Raf/MAPK, car elle est impliquée dans la

différenciation chondrocytaire et l'arthrose (Im et al., 2007), et c'est une voie qui peut être activée via d'autres récepteurs membranaires comme les ER (Roman-Blas et al., 2009).

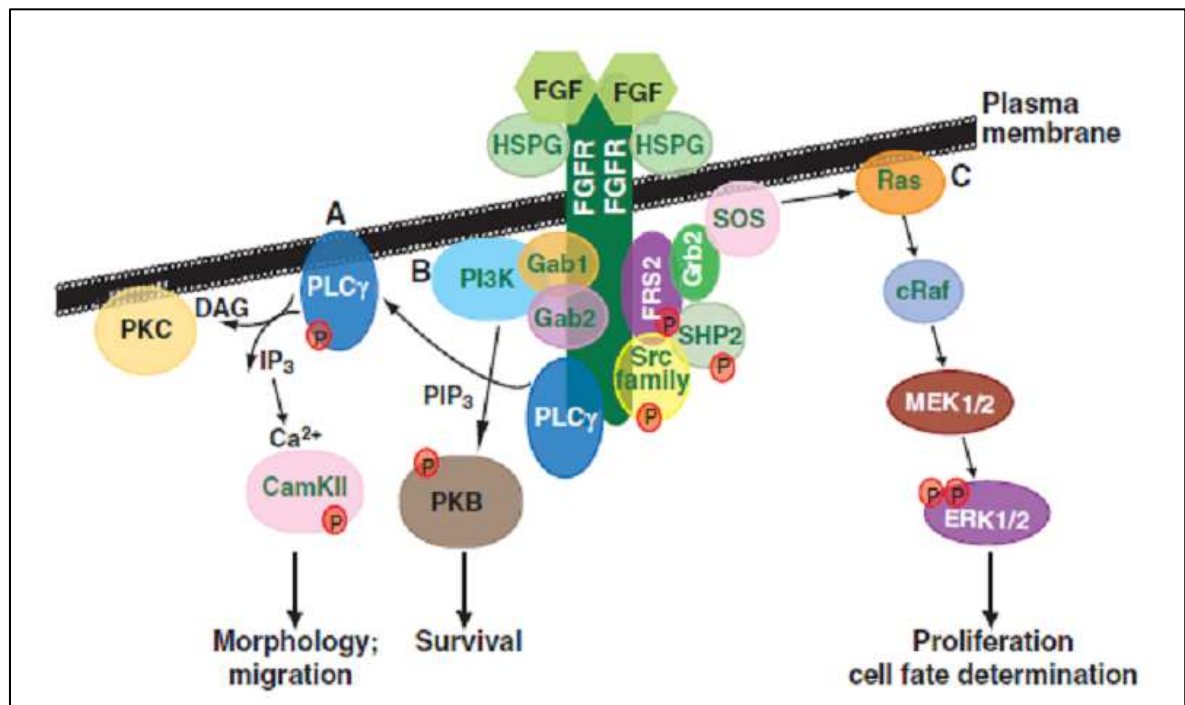


Figure 16 : Diversité des différentes voies impliquées dans la signalisation cellulaire des FGFs/FGF-Rs. (Dorey and Amaya, 2010)

4. Rôles des FGFs

Les rôles des FGFs ont été en partie révélés grâce à l'invalidation des gènes FGF chez la souris. Plusieurs fonctions ont ainsi pu être schématiquement répertoriées :

- les FGFs paracrines jouent un rôle fondamental et leur invalidation chez la souris donne des individus non viables. Ils sont également impliqués dans le développement de l'organisme en général.
- Les FGFs intracrines sont impliqués dans le développement et les fonctions neuronales,

- Les FGFs endocrines ont plutôt une influence sur le développement et le métabolisme.

Chez l'homme, de nombreuses mutations ont été identifiées dans les gènes des FGFs et surtout de leurs récepteurs, à l'origine de plusieurs pathologies parmi lesquelles les pathologies du **squelette osseux comme l'achondroplasie**.

Enfin, les FGFs sont aussi impliqués dans des phénomènes paranéoplasiques (Billottet et al., 2002), facilement explicables par leur puissant pouvoir mitogène et angiogénique (Schweigerer et al., 1987).

4.1. Rôle des FGFs lors de l'embryogenèse

Les FGFs interviennent de manière très précoce dans le développement général de l'embryon, dans de très nombreux phénomènes à partir de l'implantation post-fécondation, comme la définition du trophoctoderme et de l'endoderme primitif chez la souris, et dans l'induction du mésoderme chez le xénope (Dorey and Amaya, 2010). Au sein de l'embryon, les FGFs ont la capacité de promouvoir la formation des trois axes de l'embryon : l'axe antéro-postérieur, l'axe dorso-ventral et l'asymétrie gauche-droite. Pour cela, ils interagissent avec de nombreux morphogènes, comme l'acide rétinoïque, Shh, les BMPs et la voie de signalisation Wnt/b-Caténine.

4.2. Implication des FGFs lors du développement du squelette.

Les FGFs paracrines sont impliqués précocement dès le stade de condensation des cellules mésenchymateuses (expression de FGF2, 5, 6, 7, 9, 10, 18...) et ils interviennent dans le développement des somites et des os longs, tant au niveau du cartilage que du tissu osseux (Ornitz and Marie, 2002).

Lors de la somitogenèse qui conduit à la formation du squelette axial (vertèbres, disques intervertébraux, et cage thoracique), existe une horloge, le « *Clock and Wavefront* », dont la périodicité d'expression génique correspond à la formation d'un somite. L'horloge de segmentation se compose d'un oscillateur transcriptionnel appartenant principalement aux voies de signalisation FGF, Wnt et Notch, On observe un gradient inverse d'acide rétinoïque et de FGF8. L'acide rétinoïque est plus concentré au niveau du pôle antérieur plus différencié, tandis que la concentration de FGF8 est très forte au niveau du pôle postérieur indifférencié,

où il est fortement mitogène. Ce gradient régule une horloge Wnt qui, à son tour régule une horloge Notch/Hes (Dorey and Amaya, 2010).

Au cours de la formation des os longs, les récepteurs des FGFs sont présents dans les cellules mésenchymateuses des bourgeons de membres, avant et après induction chondrogénique. FGFs et R-FGFs sont ensuite présents dans le patron cartilagineux puis dans le cartilage de croissance à tous les stades de maturation du cartilage et de la croissance osseuse (Figure 14). Les plus importants semblent être le FGF2 (ou bFGF) et le FGF18. Les FGFs (dont FGF 1, 2, 4 18) sont également exprimés au sein du périchondre et tout au long de la différenciation ostéoblastique, que ce soit au sein de l'os endochondral ou de l'os endomembranaire.

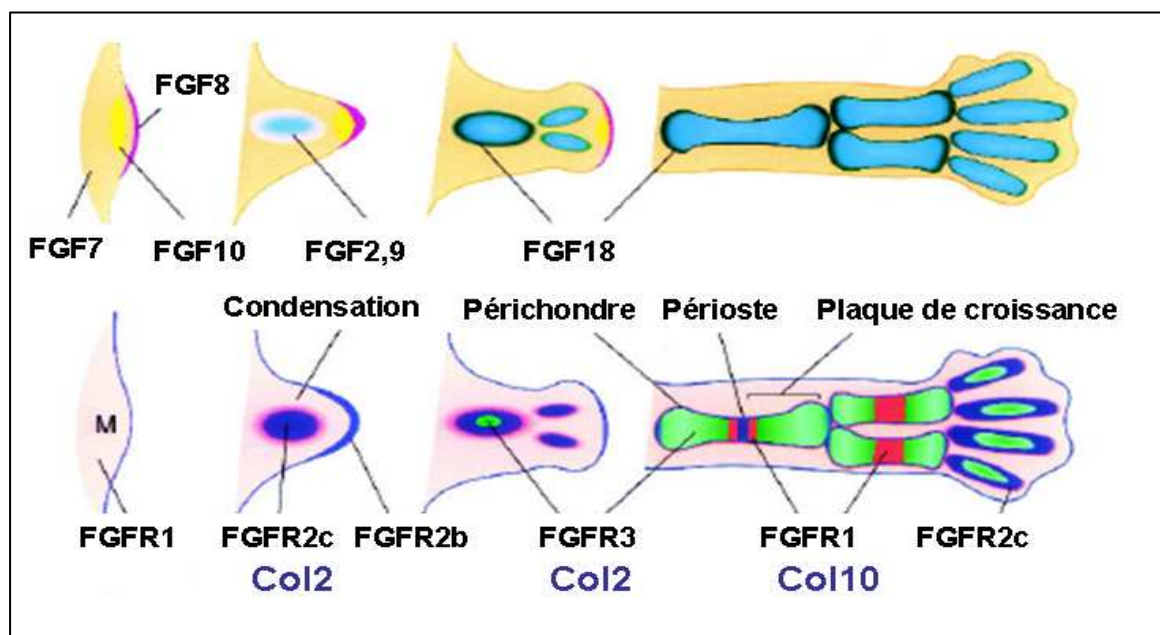


Figure 17 : Représentation schématique de l'expression de différents FGFs et leurs récepteurs au cours de la squelettogenèse. En haut, l'expression des différents FGFs dans les cellules mésenchymateuses (M) et durant les différentes étapes de l'ossification endochondrale. En bas, l'expression des FGF-Rs correspondants. Les marqueurs collagéniques spécifiques correspondant aux différents stades sont indiqués en dessous en bleu (Ornitz and Marie, 2002).

4.3. FGF-Rs et la formation du squelette

Dans l'embryon humain, FGFR1, 2 et 3 sont exprimés de manière séquentielle ; FGR1 est exprimé dès la phase d'initiation de condensation du mésenchyme, dans les bourgeons de membre, suivi de FGFR2. Lors de la maturation chondrocytaire, les cellules expriment FGFR3 tandis que l'expression de FGFR1 et 2 est restreinte au périchondre.

Lorsque l'ossification endochondrale se poursuit vers la phase d'ossification, on retrouve FGFR1 au niveau des chondrocytes hypertrophiques, du périchondre, du périoste et du tissu osseux minéralisé, tandis que FGFR2 est plutôt exprimé dans le cartilage péri-articulaire et dans le périoste. L'expression de FGFR3 est conservée dans les chondrocytes matures jusqu'à l'hypertrophie (Delezoide et al., 1998).

Chez l'homme, des mutations au sein de *Fgfr3*, pour la majorité autosomiques dominantes, donnent lieu à une maladie constitutionnelle de l'os, l'achondroplasie, qui peut être létale à la naissance ou induire un nanisme avec raccourcissement de la racine des membres et un visage caractéristique. C'est le cas le plus fréquent des nanismes d'origine génétique.

D'autres pathologies, plus localisées, touchent plus le développement facial et cranial, comme les craniosynostoses (fusion prématurée des sutures du crâne du nouveau né), et concernent *Fgfr* 1, 2 et 3. Elles peuvent être associées, mais pas de manière obligatoire, à des malformations des extrémités des membres (mains, pieds) (Hall, 2002).

La surexpression de FGFR3 chez la souris entraîne une diminution de la longueur de l'os avec une diminution de la zone proliférative et de la zone hypertrophique, un retard de formation des centres secondaires d'ossification, ainsi que des malformations squelettiques (Wang et al., 2001). Cette hypothèse semble être confirmée sur des travaux chez des souris homozygotes mutantes pour *Fgfr3*, outre les anomalies sévères du squelette axial et appendiculaire qu'elles présentent, les analyses histologiques des tissus révèlent que la plaque de croissance des vertèbres est plus épaisse chez les animaux invalidés, phénomène surtout lié à une augmentation de la zone de chondrocytes hypertrophiques, sans modification des chondrocytes en prolifération (Deng et al., 1996).

Au sein du cartilage articulaire, FGFR1 et FGFR3 sont exprimés de manière prédominante. En l'absence de *Fgfr3*, il y a une augmentation de l'expression de *Fgfr1*, et inversement, suggérant que, bien qu'ils aient des rôles distincts, ces récepteurs pourraient se substituer l'un à l'autre (Wang et al., 2001; Weng et al., 2012). FGFR1 et FGFR3 auraient un rôle catabolique, entraînant une augmentation de MMP13 et une dégradation des composés majeurs de la matrice, agrécane et COL2 (Yan et al., 2011)

En conclusion, l'implication presque ubiquitaire des FGFs au cours de développement, y compris au cours de la squelettogenèse, s'explique en grande partie par la grande diversité de ces facteurs de croissance (22) et de leurs récepteurs (4x2). Dans les conditions normales, les FGFs contrôlent très finement et spécifiquement un certain nombre de processus de morphogenèse, de différenciation et de prolifération cellulaire. On peut aisément imaginer que

dans des conditions où les facteurs FGFs sont libérés en grande quantité (exemple, dans le cartilage dont la matrice est dégradée), ou lorsque la nature ou le nombre des FGF-R changent sur les cellules cibles, les effets de ces facteurs deviennent anarchiques. C'est l'un des volets étudiés dans ce travail, tout particulièrement en ce qui concerne le bFGF ou FGF2.

5. Le FGF2 ou basic FGF (bFGF)

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au FGF2 ou bFGF. FGF2 et FGF1 (ou acide FGF, aFGF) ont été purifiés en même temps à partir d'hypophyse bovine (Gospodarowicz, 1975). Le gène du *Fgf2* humain est situé sur le chromosome 4, avec un locus de plus de 36kb. *Fgf2* contient 3 exons et 2 introns, ainsi que de grandes régions non codantes en 5' et en 3'. Ces grandes régions non codantes sont impliquées dans la régulation de la transcription de *Fgf2* (Shibata et al., 1991). Le bFGF a tout d'abord été caractérisé comme une protéine de 18kDa, produite en tant que précurseur de 155 acides aminés, et seulement 146 acides aminés pour la protéine mature. Comme les autres FGFs, la structure du bFGF est essentiellement composée de feuillets β . Il existe une traduction alternative au sein de l'ARN messager, due à la présence de codons CUG en amont du codon classique d'initiation de la traduction AUG. La présence de ces différents codons d'initiation de la traduction donne donc naissance à plusieurs isoformes protéiques. Si l'isoforme de base du bFGF fait donc 18kDa, il existe 4 autres isoformes de poids moléculaire plus élevés de 22 ; 22,5 ; 24 et 36 kDa. Toutes ces isoformes de poids plus élevés contiennent un domaine NLS (signal de localisation nucléaire) alors que l'isoforme de base de 18kDa n'en a pas, et est donc plutôt cytosolique.

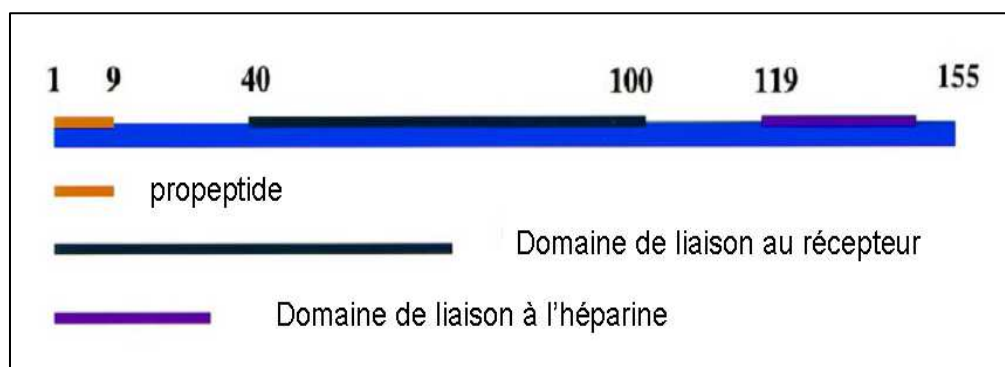


Figure 18 : Structure du précurseur de la protéine bFGF (isoforme de 18kDa) selon (Okada-Ban et al., 2000). La grande barre bleue représente la séquence peptidique du précurseur du bFGF. Le propeptide en jaune sera clivé. Le bFGF a un domaine de liaison à un FGFR et un domaine de liaison à l'héparine.

Les isoformes comprennent toutes 3 domaines de base : le propeptide, qui sera clivé par la suite, le domaine de liaison au récepteur et le domaine de liaison à l'héparine.

L'isoforme de 18kDa peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire par un mécanisme encore inconnu. Le bFGF peut alors avoir une activité paracrine ou autocrine par l'intermédiaire de ses récepteurs spécifiques FGFRs. Le bFGF peut se lier aux quatre types de FGFRs, avec une spécificité plus ou moins importante selon le récepteur et le tissu.

- L'activation des voies de signalisation est la même que pour les autres FGFs contenant un site de liaison au récepteur : la liaison du bFGF à son récepteur, entraîne la dimérisation du récepteur FGFR lui-même, entraînant une transphosphorylation des domaines tyrosine-kinase des deux parties du dimère, et permettant ainsi l'activation des cascades de signalisation propres aux FGFRs. Le bFGF peut également former un complexe avec son récepteur et avec l'héparine, et plus exactement les chaînes d'héparane sulfate de certains glycosaminoglycanes, comme le perlecan, et activer d'autres voies de signalisation (Yayon et al., 1991). Les autres isoformes de bFGF de haut poids moléculaires peuvent stimuler les mêmes récepteurs mais étant nucléaires, elles n'ont pas les mêmes cibles et les mêmes mécanismes d'action ; elles sont considérées comme des formes intracrines du bFGF. Elles pourraient avoir une action sur la régulation du cycle cellulaire (Kilkenny and Hill, 1996).

Les fonctions les plus connues du bFGF sont attribuées à l'isoforme de 18kDa. Comme beaucoup de FGFs, le bFGF est un **puissant mitogène**, ayant un rôle dans le remodelage et la réparation tissulaire (Basilico and Moscatelli, 1992). Cette fonction mitogène est illustrée par le rôle angiogénique du bFGF qui peut stimuler des cellules endothéliales quiescentes et induire leur prolifération.

De par son fort pouvoir mitogène *in vivo* et *in vitro*, et son activité pro-angiogénique, il est impliqué dans les processus de réparation tissulaire mais aussi dans la progression de certaines tumeurs et dans l'induction de métastases. A son pouvoir mitogène s'ajoute le fait qu'il peut bloquer l'apoptose des cellules, comme c'est le cas pour des cellules neuronales et des cellules gliales.

L'invalidation du bFGF chez la souris entraîne une perte de tonus vasculaire, de neurones corticaux et des défauts de réparation au niveau du cœur, mais les souris KO pour *Fgf2* sont parfaitement viables et n'ont pas d'altération squelettique (M. Zhou et al., 1998).

En revanche, des souris mutantes avec surexpression du bFGF montrent des malformations squelettiques avec des os longs raccourcis et une macrocéphalie.

6. bFGF et squelette ostéo-articulaire.

Le bFGF, ainsi que le FGF18, sont observés très précocement lors de l'embryogenèse, en particulier dans les cellules mésenchymateuses en condensation dans les bourgeons de membres. De plus, le bFGF est exprimé tout au long du processus d'ossification endochondrale, Il a été le premier FGF isolé à partir de chondrocytes de la plaque de croissance (Sullivan and Klagsbrun, 1985).

Le bFGF régule la croissance longitudinale de l'os endochondral. Une délétion ciblée du bFGF montre qu'il y a altération du processus de maturation cellulaire des chondrocytes de la plaque de croissance. Elle engendre un défaut d'ostéoblastogenèse en diminuant la longueur et la densité des os, évoquant un rôle de régulation lors de la transition cartilage-os (Montero et al., 2000).

Dans le cartilage de croissance, le bFGF exerce un contrôle négatif sur la croissance longitudinale de l'os endochondral en modulant les facteurs de croissance environnementaux.

Ses effets sont illustrés sur la figure 19 et peuvent se résumer comme suit :

- le bFGF stimule la production de PTHrP, qui inhibe la maturation chondrocytaire et la minéralisation (Terkeltaub et al., 1998).
- D'autre part, le bFGF inhibe la production d'Ihh, inhibant ainsi la prolifération des chondrocytes (Minina et al., 2002).
- Le bFGF antagonise les effets des BMPs et de l'IGF1, qui sont plutôt impliqués dans la prolifération chondrocytaire (Minina et al., 2002).

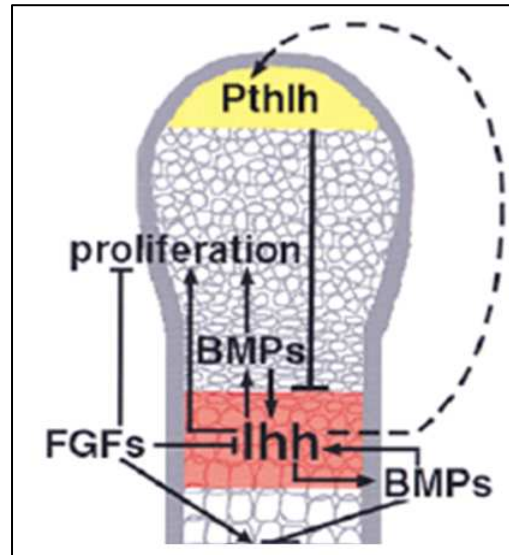


Figure 19 : Schéma de la régulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes de la plaque de croissance par l'axe PTHrP/Ihh, les FGFs et les BMPs. (D'après (Minina et al., 2002)). Le bFGF stimule la production de PTHrP, et inhibe la production d'Ihh. Enfin, il antagonise les effets des BMPs. Il en résulte un contrôle négatif sur la prolifération des chondrocytes.

Le bFGF agit donc dans la plaque de croissance en amont du système Ihh/PTHrP. La résultante de ces interactions aboutit à un contrôle NEGATIF du bFGF sur la prolifération des chondrocytes et leur entrée en hypertrophie.

Toutefois le rôle du bFGF sur la prolifération des chondrocytes est beaucoup plus complexe, en particulier lorsqu'il s'exerce sur les processus de réparation de l'os par ossification endochondrale ou dans le cartilage articulaire.

6.1. bFGF , facteur de prolifération des chondrocytes.

In vivo, le bFGF a été étudié dans des cas de réparation osseuse, qui fait intervenir pour les os longs une phase de chondrogenèse. Dans un modèle de fracture tibiale chez la souris, une injection de bFGF au site de la fracture augmente la taille du callus cartilagineux, mais il est sans effet au niveau du processus d'ossification (Schmid et al., 2009). Le même effet sur le callus est observé chez le rat (Nakajima et al., 2001) ou chez le lapin après une immobilisation des genoux par destabilisation du ménisque (Okazaki et al., 1996) : le traitement par bFGF s'accompagne d'une prolifération des chondrocytes sans synthèse de matrice.

Des arguments expérimentaux suggèrent que le bFGF augmenterait 1) le recrutement de cellules préchondrogéniques, et 2) la prolifération de ces cellules, sans activer la différenciation chondrogénique (Mancilla et al., 1998).

In vitro, d'autres études sont en faveur de l'hypothèse de « recrutement » de cellules préchondrogéniques. Sur des cellules souches mésenchymateuses humaines, le bFGF diminue l'expression de marqueurs de cellules souches (Oct3/4, Nanog) et augmente la prolifération cellulaire (Handorf and Li, 2011). Il joue également le rôle de facteur de prolifération sur des cellules souches mésenchymateuses humaines provenant de la moelle osseuse, mises sous forme de micromasses et traitées ensuite avec de la BMP-2 et du TGFβ3 pour induire la différenciation (Perrier et al., 2011).

L'effet prolifératif du bFGF est confirmé sur des chondrocytes en culture par de nombreux travaux y compris ceux du laboratoire (Nataf et al., 1990; Yan et al., 2011).

6.2. bFGF, facteur de dédifférenciation des chondrocytes.

Un certain nombre de travaux montre que le bFGF stimule la prolifération des chondrocytes et diminue leur degré de différenciation.

Des cellules souches induites par du TGFβ expriment des marqueurs spécifiques de la différenciation chondrogénique comme COL2 et COL10, et cette stimulation est contrée par l'ajout de bFGF. Il en est de même pour la minéralisation (switch vers la différenciation ostéogénique) : TGFβ stimule l'activité des phosphatases alcalines, contrée aussi par l'ajout de bFGF (Weiss et al., 2010). Le bFGF a alors un effet dédifférenciant sur les cellules induites vers la différenciation chondrogénique. Dans des chondrocytes de lapins prépubères, il diminue l'incorporation de sulfate au sein des protéoglycanes ainsi que l'expression du collagène de type 2 (Nataf et al., 1990) et dans des chondrocytes humains en culture, il entraîne une perte de protéoglycanes (Yan et al., 2011).

6.3. bFGF, facteur de dégradation de la matrice du cartilage articulaire

Son rôle sur des cellules différenciées est aussi catabolique : dans un disque intervertébral bovin après blessure mécanique, il stimule l'expression de MMP13, inhibe la synthèse de

protéoglycanes et antagonise les effets de BMP-7 qui induit la différenciation (Ellman et al., 2008).

Sur des chondrocytes articulaires humains, on retrouve la stimulation de l'expression de MMP13 par le bFGF, confirmant son rôle dans le remaniement de la matrice (Im HJ. et al., 2007).

Outre la capacité de stimuler l'expression de MMP13, le bFGF peut stimuler l'expression des agrécanases (ADAMTS4 et 5), la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), source de stress oxydant, ainsi que l'expression de IL-1 β et de TNF α , qui sont des médiateurs de l'inflammation et de la dégradation du cartilage (Ellman et al., 2008). Enfin, la présence de bFGF dans le liquide synovial de patient atteint d'arthrite rhumatoïde semble fortement corrélée avec le grade de destruction osseuse. C'est également le cas pour l'arthrose (Nakashima et al., 1994).

Le bFGF peut être stocké au niveau de la matrice, comme bon nombre de facteurs de croissance. La dégradation de la matrice après stimulation par le bFGF pourrait entraîner le relargage d'autres molécules de bFGF, nourrissant un cercle vicieux dans la dégradation du cartilage.

Enfin, le bFGF pourrait être un méchanotransducteur au sein du cartilage : bFGF est présent dans la MEC du cartilage et peut être libéré de l'héparane sulfate par traitement à l'héparitinase. Il est localisé avec le perlecan, un protéoglycane portant des chaînes d'héparane sulfate, dans toutes les zones du cartilage ; de plus le perlecan lie le bFGF recombinant *in vitro* : perlecan et bFGF pourraient se lier dans le cartilage au sein de la matrice, avec de multiples effets. Leur combinaison aurait une activité dans la transduction de signaux mécaniques au sein du cartilage (Vincent and Saklatvala, 2006). Le perlecan pourrait aussi jouer le rôle de stabilisateur de la liaison du bFGF à son récepteur. Grâce à ses chaînes de chondroïtine sulfate, il pourrait également servir d'amarre pour le bFGF aux fibres de collagènes au sein de la matrice, expliquant entre autres le stockage des facteurs de croissance dans la matrice (Hayes et al., 2008).

Un schéma des mécanismes possibles pouvant permettre au bFGF de jouer un rôle fondamental dans la dégradation de la matrice du cartilage est représenté sur la figure 20.

Dans le cartilage articulaire, l'effet de bFGF est médié par FGFR1 et 3, entraînant respectivement la prolifération et la dédifférenciation des cellules. Selon Ellman et al (Ellman et al., 2008), l'effet du bFGF passe préférentiellement par FGFR1

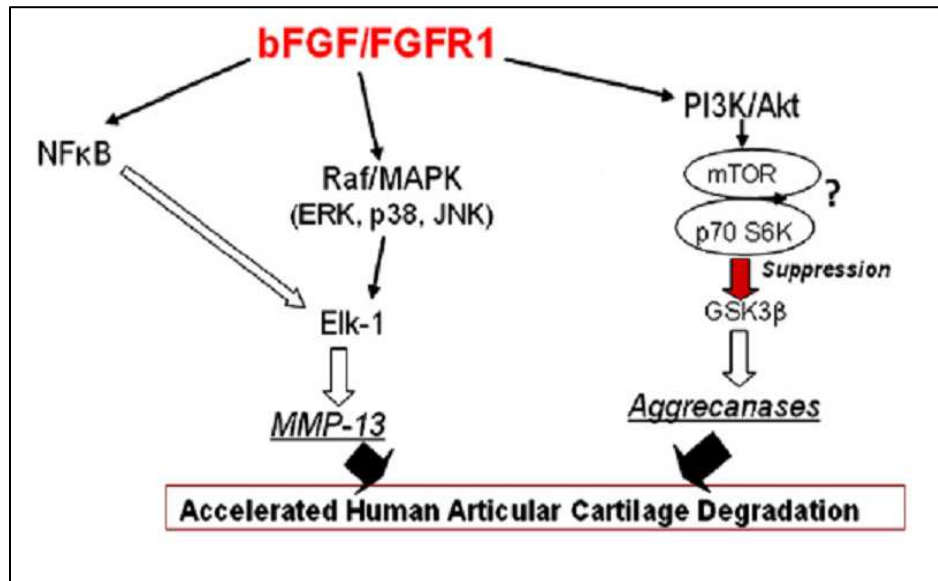


Figure 20 : Schéma des différentes voies de signalisation pouvant être impliquées par le bFGF dans la dégradation du cartilage articulaire (Ellman et al., 2008). La fixation de bFGF sur FGFR1 entraînerait une activation de la voie des MAPK d'un côté, entraînant la stimulation de l'expression de MMP13, de l'autre une activation de la voie PI3K/Akt qui engendre la prolifération des cellules et la stimulation de l'expression des agrécanases.

En conclusion, nous pouvons dire que le bFGF a plusieurs types d'action différents. Son activité dépend de nombreux facteurs : le stade de différenciation des cellules, leur environnement, qui comprend les autres facteurs de croissance en présence, et sa propre concentration.

Le bFGF est connu pour être un facteur de prolifération et de dédifférenciation au sein des chondrocytes en culture ; au sein du cartilage de croissance, il est au contraire un inhibiteur de la prolifération et de la maturation chondrocytaire ; Dans le cartilage articulaire, il est amarré aux fibres de collagène et stocké dans la matrice, jusqu'à ce qu'une dégradation de cette dernière, qu'il peut stimuler, provoque son relargage. Ce relargage pourrait aggraver la dégradation de la matrice comme dans l'arthrose, et expliquer la prolifération chondrocytaire observée dans ce cas. Enfin, une mauvaise qualité de la matrice pourrait permettre un relargage accru de ce facteur de croissance, entretenant le cercle vicieux.

V. Polluants atmosphériques et squelette.

1. Premières observations : les métaux lourds

Les premières observations de polluants environnementaux touchant le squelette concerne des intoxications à haute dose à des métaux lourds, comme l'intoxication de Minamata, hautement tératogène, officiellement découverte en 1956 (Harada, 1995). Parmi les métaux lourds, une exposition *in utero* au plomb chez l'homme entraîne un retard de croissance, et les taux sériques de plomb sont inversement corrélés avec la croissance (Holz et al., 2012). Chez les rongeurs, le plomb a la capacité d'altérer le développement du squelette, en perturbant non seulement la différenciation ostéoblastique (Ronis et al., 2001) mais aussi la différenciation chondrogénique, en supprimant l'expression de certains de ses marqueurs (Hicks et al., 1996). Le cadmium est oestrogénique et peut donc directement influencer la croissance endochondrale (Paik et al., 2003; Wardell et al., 1982).

2. Ligands AhR (Dioxines et Hydrocarbures aromatiques) et squelette

La croissance du cartilage et l'ossification endochondrale sont sous le contrôle de plusieurs hormones, depuis le stade fœtal en passant par la naissance (hormones thyroïdiennes, hormone de croissance hypophysaire), la puberté et la ménopause chez la femme (stéroïdes sexuels, Vitamine D, PTH...), et enfin le vieillissement (voir plus haut, chapitre cartilage).

Les dioxines, rendues célèbres par l'usage du défoliant Agent Orange au Viet-Nam (Ngo et al., 2006) et l'accident de Seveso en 1976 sont une série de molécules hétérocycliques portant un nombre variable d'atomes de chlore. Le chef de file est la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), interfèrent avec de nombreuses voies endocriniennes, essentiellement la stéroïdogénèse ovarienne (Moore et al., 1991) et les récepteurs aux estrogènes (Safe et al., 2000)

Il y a peu d'études concernant spécifiquement les effets des dioxines sur le cartilage. *In vitro*, la TCDD induit la mort apoptotique des chondrocytes par dommage oxydatif (Lee and Yang, 2010). Une exposition utérine et lactationnelle à la TCDD affecte le développement osseux des jeunes singes, modifie le contenu minéral osseux et altère la

résistance mécanique de l'os (Hermesen et al., 2008). La TCDD perturbe le développement embryonnaire chez les poissons et occasionne des malformations du cartilage, associées à une diminution du COL2 (Dong et al., 2012).

Le tabagisme, par les ligands AhR présents dans le tabac, induit une perte du cartilage articulaire chez l'homme (Davies-Tuck et al., 2009). Chez la souris, ces composés induisent une inhibition de la chondrogenèse (Kung et al., 2012) et une diminution de la capacité de réparation aux fractures chez les souris exposées à la fumée de cigarette (El-Zawawy et al., 2006). Chez l'homme, la capacité de réparation de fracture est plus faible chez les fumeurs, qui sont exposés aux HAPs (Hastrup et al., 2010; Høidrup et al., 2000).

Les PCBs (polychlorinated biphenyls), très utilisés auparavant pour leurs propriétés d'isolant électrique dans de l'équipement tels que des fours à micro-ondes ou des adhésifs, sont liposolubles et peuvent être retrouvés dans l'alimentation et dans le lait maternel (Gladden et al., 1988). Ils semblent être associés à la survenue de l'arthrite chez l'homme (Lee et al., 2007), tandis qu'ils ont un effet à la fois sur la formation du cartilage et sur la minéralisation osseuse chez le rat (Cocchi et al., 2009).

3. Rôle des pesticides

Différents pesticides (Thirame, triazoles) provoquent des anomalies multiples du cartilage dans des modèles de mammifères ou d'oiseaux, notamment la formation de cartilage ectopique (Menegola et al., 2005; Misawa et al., 1982; Rath et al., 2007). Le Thirame, un fongicide, peut induire des malformations comme la dyschondroplasie tibiale ou l'arrêt du développement de l'os endochondral chez les races aviaires (Genin et al., 2012; Rasaputra et al., 2013). Enfin, certaines études montrent que le raccourcissement des membres chez certains enfants a pu être associé à l'exposition de leurs parents à des pesticides (Kristensen et al., 1997; Lin et al., 1994; Schwartz and LoGerfo, 1988).

4. Perturbateurs endocriniens et squelette.

On sait que cartilage et os sont des organes cibles des hormones (voir plus haut, chapitre cartilage). La croissance du cartilage et l'ossification endochondrale sont en effet

sous le contrôle de plusieurs hormones, depuis le développement fœtal où le système hormonal se met en place, en passant par la naissance (hormones thyroïdiennes, hormone de croissance hypophysaire), la puberté et la ménopause chez la femme (stéroïdes sexuels, Vitamine D, PTH...), et lors du vieillissement.

Ce tour d’horizon de potentiels effets sur le squelette montre que ce dernier, et en particulier pendant sa formation via le cartilage, peut être la cible des polluants environnementaux. Toutefois, il y a peu d’informations caractérisant les effets des perturbateurs endocriniens sur le cartilage, que ce soit sur son développement ou sur son vieillissement. Nous nous sommes donc intéressés à cela dans notre travail, en particulier avec les perturbateurs endocriniens suivants.

4.1. Génistéine et squelette

Des études ont été conduites sur les effets de la génistéine sur l’os, en particulier la perte osseuse post-ménopausale. Certaines études montrent un effet protecteur sur l’os (Anderson and Garner, 1998; Zhang et al., 2008), mais les études de cohorte sur les femmes ne sont pas assez concluantes pour définir si les effets de la génistéine sont réellement bénéfiques pour traiter l’ostéoporose post-ménopausale (Patisaul and Jefferson, 2010).

Peu de données sont disponibles concernant les effets de la Génistéine sur le squelette. *In vitro*, plusieurs études indiquent qu’elle peut jouer un rôle dans le remaniement osseux. La génistéine dans les ostéoblastes augmente la quantité d’ADN et de protéine ainsi que l’activité phosphatase alcaline (PAL) (Sugimoto and Yamaguchi, 2000). Des données contradictoires montrent que la génistéine peut au contraire promouvoir l’apoptose des ostéoblastes en activant la caspase 3 et cliver certaines molécules d’adhésion (Hunter et al., 2001). Toutefois, des données en faveur d’une diminution de maturation des pré ostéoclastes en ostéoclastes en

présence de génistéine, (Gao and Yamaguchi, 1999) favorisent l’hypothèse d’une influence protectrice de la génistéine sur l’os.

Concernant le **cartilage**, les données disponibles sont encore plus restreintes. Des expérimentations *in vitro* sur des chondrocytes humains montrent que la génistéine diminue la production de cyclo-oxygénase 2 (COX2) et de NO, induite par des lipopolysaccharides, évoquant un potentiel anti-inflammatoire de la génistéine sur les chondrocytes (Hooshmand et al., 2007). Sur des chondrocytes articulaires bovins en culture primaire, la génistéine diminue le nombre de chondrocytes marqués par ER  et la synthèse de protéoglycanes, sans modification de l’incorporation de sulfate. Comme attendu, un traitement par IGF-1 augmente l’incorporation de sulfate ; cette augmentation est amplifiée si les chondrocytes sont pr incub s avec de la génistéine, démontrant que son action peut dépendre de la présence de facteurs de croissance (Claassen et al., 2008). *In vivo*, l’effet de la génistéine sur la synthèse de protéoglycanes est confirmée dans une étude à dose sub-NOAEL (50mg/kg/d) où une diminution de l’épaisseur de la plaque de croissance dans du cartilage condyla re mandibulaire est observée chez le rat (Yu et al., 2012). La génistéine a donc des effets sur le squelette et plus précisément sur le cartilage, mais ces effets ne sont pas bien déterminés et demandent plus d’études.

4.2. Vinclozoline et squelette

Il n’existe quasiment pas de données actuellement sur les possibles effets de la vinclozoline sur le squelette. Toutefois, une étude récente sur l’exposition *in utero* au BPA, seul ou associé à la génistéine ou la vinclozoline montre une activité de ces mélanges sur le développement des doigts. De plus, les mâles non traités de la génération F2 issus de pères exposés montrent les mêmes effets, suggérant une activité transgénérationnelle possible. Ces composés, dont la vinclozoline pourraient donc avoir un effet sur le développement des os longs, initié sur le cartilage (Auger et al., 2013; Zheng and Cohn, 2011).

4.3. BPA et squelette

La conséquence d’une exposition au BPA sur le squelette est peu connue. Certaines données récentes montrent que le BPA peut avoir des effets tératogènes sur des embryons de

Xénope, engendrant des scolioses et des malformations (Iwamuro et al., 2003) ; il peut également stimuler la prolifération cellulaire et l'expression de marqueurs osseux dans cellules ostéoblastiques de calvaria de rat (Rucinski et al., 2006). Il empêcherait aussi la perte osseuse sur des souris déficientes en aromatase, en augmentant l'expression de IGF-1 et en empêchant la réduction de la masse osseuse (Toda et al., 2002). A des doses relativement élevées *in vitro* (entre $[10^{-6}\text{M}]$ et $[10^{-5}\text{M}]$) le BPA supprime l'activité ostéoblastique et ostéoclastique chez le poisson rouge et sur des cellules souches induites de souris (Hwang et al., 2013). Il n'y a quasiment pas de données sur les possibles effets du BPA sur le cartilage. Il semble interférer avec l'effet chondroprotecteur de l'estradiol dans des chondrocytes arthritiques (Wang et al., 2010), du fait de son potentiel estrogénique. Il n'y a pas d'autres preuves de sa possible activité sur le cartilage.

En conclusion, les perturbateurs endocriniens que nous étudions, G, V et BPA, peuvent avoir pour cible le cartilage. Le nombre de données concernant leurs effets est cependant très réduit. Toutes les données indiquent qu'ils peuvent avoir des effets en dessous de la dose NOAEL et pendant une exposition *in utero*. Malgré leur estrogénicité plus faible que l'estradiol, ils ont tous une composante estrogénique et peuvent donc perturber la formation du cartilage. C'est l'existence de cette perturbation et sa nature que nous allons essayer de déterminer dans ce travail.

Objectifs du travail

Nous sommes exposés à de nombreux Perturbateurs Endocriniens chaque jour, en provenance de plusieurs sources (alimentation, air, eau...). La vinclozoline, la génistéine et le BPA sont particulièrement présents dans l'alimentation et leur exposition peut commencer dès la vie fœtale. Au vu de leur interférence avec les récepteurs aux estrogènes (ER) et aux androgènes (AR) pour la vinclozoline et son métabolite actif M2, nous avons voulu déterminer quels pouvaient être les effets de ces perturbateurs endocriniens sur le développement du cartilage, et donc du squelette.

Pour étudier ces effets, notre étude comporte plusieurs volets :

- une partie *in vivo*, pour déterminer les effets éventuels des perturbateurs endocriniens sur le développement du squelette du rat Wistar, à faibles doses.
- Une partie *in vitro*, afin de connaître les effets des PE sur les marqueurs phénotypiques du cartilage, dans un modèle d'induction chondrogénique et dans un modèle de chondrocytes en culture.

Dans la discussion, nous analyserons nos résultats sur les effets de PE observés. Nous nous sommes focalisés sur les effets développementaux des PE sur le cartilage et leur possible retentissement sur des pathologies articulaires comme l'arthrose et l'intégrité du squelette en général.

Matériels et Méthodes

Produits chimiques :

Les composés chimiques suivants : vinclozoline, génistéine, Bisphénol A, DRB, CHX, SB203580, ainsi que le Fulvestrant, proviennent de Sigma France. Le métabolite M2 provient de Cayman France.

I. PARTIE *IN VIVO*

1. Animaux et protocoles d'exposition.

1.1. Animaux

Les autorités locales ont approuvé toutes les procédures impliquant les rats Wistar Han, en accord avec les règles d'éthique du Ministère de l'Agriculture pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire ainsi que l'application des Bonne Pratiques de Laboratoire. Les agréments de recherche ont été données par le comité d'éthique de l'Université de Bourgogne et ont été enregistrés sous le code : Jan/23/2006 n° E0607 and CIME : Dec/16/2009 n°A1909. Un total de 120 rats Wistar Han de qualité SPF (specific-pathogen-free, spécifiquement sans pathogènes), comprenant 60 femelles et 60 mâles âgés de 8 semaines (Harlan France Sarl; Gannat, France) ont été acclimatés à des conditions d'hébergement SPF (température ambiante de 22°C avec 55% d'humidité relative et une alternance lumière/obscurité de 12h) pendant 4 semaines avant l'accouplement. Les cages et les bouteilles sont faites de polypropylène pour éviter toute contamination par le Bisphénol A ou par les phtalates, et l'eau a été filtrée à travers du charbon actif pour éliminer toute trace de pesticide ou de contaminant endocrinien actif. Les animaux ont été nourris avec un régime sans phytoestrogène purifié (INRA, France), et ont eu un accès ad libitum à l'eau filtrée au charbon comme décrit précédemment (Eustache et al., 2009). Tous les traitements ont été administrés *per os* par gavage aux mères gestantes jusqu'à la lactation ou jusqu'à l'âge adulte. Le sevrage des petits

a été effectué à J21, les petits ont ensuite été sacrifiés pour analyses à J30 ou J110 après la naissance.

1.2. Procotole de doses sub-NOAEL

Les femelles ont été examinées quotidiennement après l'accouplement pour déterminer le premier jour de gestation (appelé J0 ou G0), par examen de la présence des spermatozoïdes dans les fluides vaginaux ou dans le bouchon muqueux. Les animaux ont ensuite été distribués de manière aléatoire dans 4 groupes correspondant aux groupes témoins (control, C), traités avec la génistéine 1 mg/kg/jour (G), la vinclozoline 1mg/kg/jour (V1), et la combinaison génistéine+vinclozoline (GV1) (15 animaux par groupe). Ces doses correspondent à des doses 100 fois inférieure au NOAEL pour la génistéine et 12 fois inférieure pour la vinclozoline. Au moment de la parturition, les portées ont été pesées et standardisées à 10 petits, le sexe de chacun des petits a été déterminé. Les mères ont ensuite été traitées de la naissance des petits jusqu'au sevrage, avec les mêmes doses orales de 1mg/kg/jour décrites plus haut. Les xénohormones G et V ont été dissoutes dans de l'huile de maïs (Carrefour, Dijon, France) et administrées avec une micropipette. Les animaux témoins ont reçu le même volume de véhicule seul (2mL/kg). Au sevrage, les jeunes mâles ont été marqués avec des puces implantées, et les rats de portées indépendantes ont été regroupés dans des cages de polypropylène (4 animaux par cage). Ils ont eu un accès ad libitum à l'eau filtrée au charbon et ont été nourris avec le même régime purifié sans soja jusqu'au sacrifice à J30 ou J110. Les mâles de la génération F1 exposés ont été accouplés avec des femelles naïves pour produire la génération F2 qui a été sacrifiée de manière similaire à J110, sans aucun traitement. Pour l'étude du cartilage, des groupes de 4 animaux ont été sélectionnés de manière aléatoire à partir des lots de chaque condition.

Ce protocole figure sous le nom de PNRPE dans le tableau 1 ci-dessous

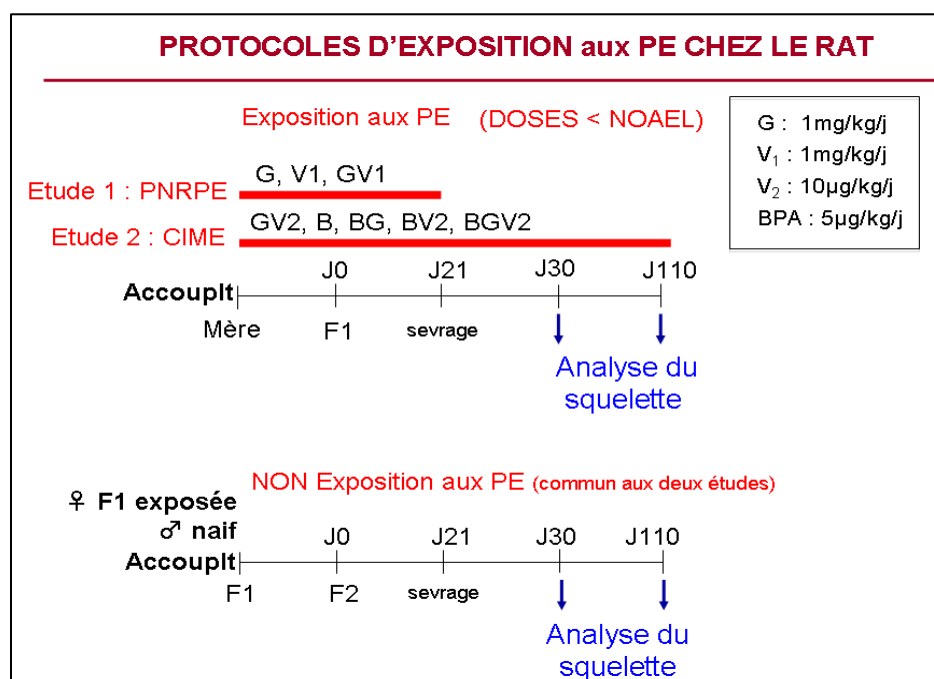


Tableau 1 : Protocoles d'exposition des deux études in vivo. Les deux protocoles d'exposition des générations F1 sont schématisés en haut. En bas, figure la partie de l'étude ayant permis d'obtenir les animaux de la génération F2, commune aux deux protocoles.

1.3. Protocole CIME, doses très inférieures au NOAEL (« Far-NOAEL »)

L'étude CIME a suivi un modèle comparable. Les rats ont été traités comme suit : témoins (contrôles, C), génistéine+vinclozoline, 1mg/kg/jour (GV1), traitement donné seulement pendant la gestation et la lactation, de manière similaire à l'étude sub-NOAEL, permettant une comparaison inter-étude. Les traitements "Far-NOAEL" étaient les suivants : bisphénol-A

5 µg/kg/jour (BPA); BPA + génistéine, 1 mg/kg/jour (BG); génistéine 1 mg/kg/jour + vinclozoline 10 µg/kg/jour (GV2); BPA + vinclozoline, 10 µg/kg/jour (BV2); BPA + génistéine 1 mg/kg/jour + vinclozoline 10 µg/kg/jour (BGV2 or BPA + GV2) (voir tableau 1, protocole CIME). Ces doses correspondent à des doses 100 fois inférieures au NOAEL pour G, 1 200 fois inférieures au NOAEL pour V et 10 à 20 fois inférieure au NOAEL pour le BPA. Les traitements ont été administrés pendant la gestation, la lactation et la vie adulte jusqu'à au sacrifice. Les mâles de la génération F1 ont été accouplés avec des femelles naïves pour engendrer la génération F2 qui a été sacrifiée de manière similaire à J110 sans traitement.

2. Analyse au micro-CT scan

Après le sacrifice à J30 ou J110, les animaux ont été placés dans une gouttière dans une position d cubitale dorsale, queue incluse, et congelés à -80 C pour le transport de l'animalerie de l'INRA (CSGA, Dijon) jusqu'à notre laboratoire.

Les vertèbres sacrées (V1-V4) sont apparues comme morphologiquement non adaptées pour les mesures, en raison de leur forme asymétrique et leur faible visibilité pour l'imagerie, même avec un appareillage permettant un scan à 180 C. En revanche, l'aspect homogène des vertèbres caudales (V5 et au-delà) a facilité l'imagerie des animaux morts. Initialement nous avons étudié les vertèbres V5   V8, puis nous avons restreint l'analyse à V5 jusqu'à V8 car les résultats étaient identiques dans les deux protocoles (figure 21). Chaque vertèbre a été mesurée individuellement pour la longueur et la largeur entre les apophyses transverses (I.T.A) de la partie supérieure des corps vertébraux à un angle d'incidence constant, les animaux ayant été immobilisés, allongés sur le dos. Les longueurs ont été cumulées pour générer le paramètre de longueur de V5   V8 alors que les valeurs des I.T.A ont été considérées séparément. Cette fois encore, 4 rats de chaque sexe ont été choisis de manière aléatoire à partir de 4 portées différentes, de 4 mères différentes par âge et par condition de traitement.

L'appareil servant au scan est un SkyScan 1178, contenant deux détecteurs aux rayons X en rotation autour des animaux immobilisés. Le scan reconstitue une image en 3 dimensions (512x512x512 pixels/cube). Le meilleur angle d'incidence a été choisi avec Windows Photoviewer parmi les 180 images prises par le scan, pour une performance et une reproductibilité optimales de densitométrie et de mesures de taille. Les images ont été

analysées avec ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov.gate2.inist.fr/ij>) pour les dimensions et la densitométrie des objets. Les conditions d'analyse étaient d'avoir une image 8-bit, un canevas de taille 1280 (largeur) – 1024 (longueur), en calibrant la mesure à 115 pixels/cm. Brièvement, toutes les données de CT-Scan montrées (figures 25, 26) appartiennent au projet CIME exclusivement, car il n'y a pas eu de mesure au CT-Scan effectuée pour l'étude PNRPE. Les mesures d'histologie (figures 28A, B ; 29A, B) ont été faites sur la génération F1 de l'étude PNRPE seulement. Exceptionnellement, l'étude de l'effet du BPA était une expérimentation appartenant au projet CIME, en raison de considérations « a posteriori » sur le manque d'effet de la dose V2. La figure 25C n'a pas de condition GV1 et a été effectuée seulement pour explorer le possible effet de la combinaison de BPA sur V ou G.

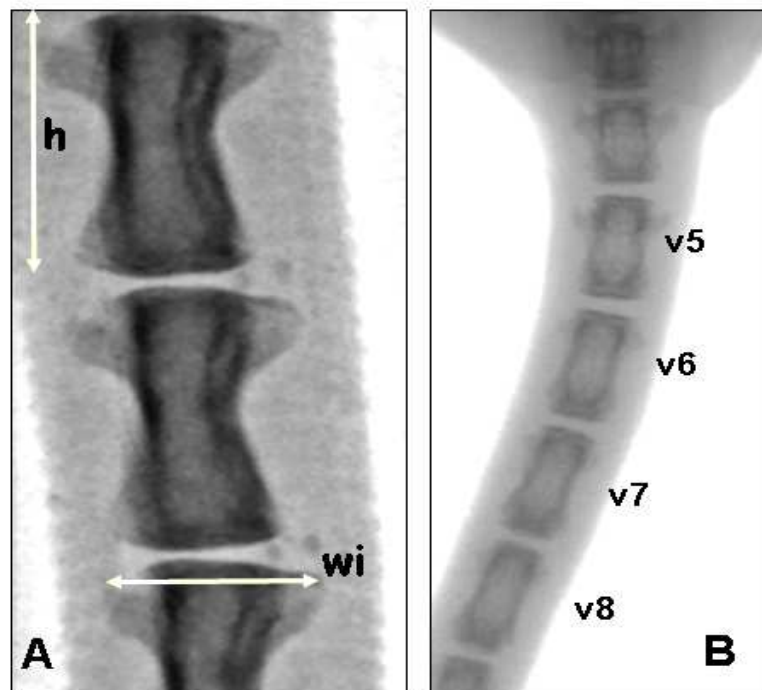


Figure 21 : Analyse type au micro-CT-Scan des vertèbres caudales. A. Mesures de la longueur de la longueur vertébrale (flèche “h”) et largeur entre les apophyses transverses (I.T.A.) (flèche “wi”). B. Les valeurs des longueurs des vertèbres ont été cumulées de V5 à V8. L’angle d’incidence a été choisi parmi 10 images prises par le scan pour une densitométrie et des mesures optimales.

3. Analyse histométrique

Une fois scannée, les queues ont été décongelées et coupées pour produire des fragments de 2 cm dans la région caudale V5-V8. Les fragments de queue ont été fixés dans du paraformaldéhyde tamponné 10% et ensuite décalcifiés en utilisant le réactif DC1 pendant 3h (Labonord, France), deshydratés, et inclus dans la paraffine. Des sections sériées sagittales (20 sections sériées de 5µm) ont été colorées au Trichrome de Masson. Encore une fois, les images ont été analysées avec ImageJ pour la densitométrie et les mesures des dimensions des zones d'intérêt. Les conditions d'analyse étaient d'avoir une image 8-bit, un canevas de taille 1280 (largeur) – 1024 (longueur), en calibrant la mesure à 1200 pixels/cm. Des séries de 4 sections ont été analysées dans chaque condition de traitement (4 mâles et 4 femelles), dans six zones du cartilage de la plaque de croissance. L'épaisseur de la plaque de croissance dans sa totalité, de la zone proliférative (P) et de la zone hypertrophique (H), ont été évaluées séparément en utilisant des coupes correctement planes.

4. Analyse statistique

Les 60 couples spécifiés plus haut correspondent à la totalité du programme généré pour les différents groupes impliqués dans le projet. Pour nos études sur le cartilage, nous avons analysé aléatoirement 4 animaux de chaque sexe et âge, provenant de portées distinctes et de mères distinctes, pour chaque condition d'exposition. De ce fait, l'individu est l'unité statistique. Les rats ont été identifiables par des codes tout au long de l'étude et les expérimentateurs n'étaient pas au courant de l'attribution des codes. Les statistiques ont été effectuées sur des expériences distinctes et les données des deux projets n'ont pas été confondues. Les statistiques ont été calculées grâce au test non paramétrique de Mann-Whitney pour des paires simples « témoins contre traités ». * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

II. PARTIE *IN VITRO*

1. Le modèle C1

1.1 Culture des cellules C1

Les cellules C1 ont été isolées par O. Kellermann en 1990, à partir de cellules mésenchymateuses pluripotentes de souris (Kellermann et al., 1990). Ce clone, selon les conditions de culture et les inducteurs en présence, permet d'induire les cellules vers trois voies de différenciation : la voie adipogénique, la voie ostéoblastique et la voie chondroblastique. Nous nous intéressons à la voie chondroblastique. Pour s'engager dans la voie de différenciation chondroblastique, les cellules doivent former des agrégats spontanément, mimant la condensation des cellules mésenchymateuses *in vivo* lors de l'élaboration des bourgeons de membre. Elles deviennent alors compétentes et peuvent être induites vers la voie de différenciation en présence d'un inducteur spécifique (Locker et al., 2004; Poliard et al., 1999).

Les cellules C1 sont conservées à -150°C dans du DMEM 4,5g Glucose (Gibco, Life Technologies)-10% sérum de veau fœtal-8% DMSO. Après décongélation rapide, et centrifugation à 1500rpm (500g), les cellules sont resuspendues dans 4ml de DMEM 4,5g glucose et mises en culture selon les trois phases successives décrites par les auteurs d'origine : amplification, compétence et différenciation chondrogénique.

La phase d'amplification est réalisée dans du milieu DMEM-4.5 g glucose, contenant du rouge de phénol, de la glutamine ainsi que des antibiotiques (pénicilline et streptomycine, concentrations respectives 25u et 25µg/mL final de milieu) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Lonza) et mises en culture à 37° en présence de 8% de CO₂. Les cellules sont amplifiées jusqu'à obtenir le nombre de cellules suffisantes pour l'expérimentation. .

Pour la phase de compétence, les cellules sont ensemencées à 10 000 cellules/cm² dans des boîtes de Pétri de 60mm non traitées en surface pour la culture (Gosselin) dans du milieu DMEM à 4,5g de glucose, ainsi que 10% de sérum de veau fœtal (Biocrom) à 37°C et 10% de CO₂. Il est alors important de toucher le moins possible aux boîtes de culture pendant 10 jours, pour maintenir constant les taux d'oxygène et de CO₂. Le milieu n'est changé qu'une fois. Toutes ces conditions évitent une prolifération trop importante et permettent une bonne agrégation des cellules.

La phase d'induction chondrogénique est alors réalisée en incubant les agrégats dans du DMEM 4,5g glucose, toujours en présence de pénicilline et streptomycine, mais dépourvu de sérum et suppléé en Dexaméthasone (Dex, [10⁻⁷M], Sigma), ainsi qu'en pyruvate et en cystéine (1mM, Sigma). Les agrégats cellulaires ne grossissent plus et deviennent de plus en plus opaques au cours de la différenciation. Le milieu est alors changé tous les trois jours pendant les 28 ou 30 jours de culture.

1.2 Traitements et inductions

Les milieux sont changés tous les 3 jours au minimum. Les perturbateurs endocriniens sont ajoutés à chaque changement de milieu à une concentration variant de [10⁻¹⁰M] à [10⁻⁶M] et l'analyse des ARN messagers et des protéines se fait 24h après le dernier changement de milieu.

1.3 Extraction des ARN totaux

Les ARN sont étudiés à différents temps de la différenciation, sur 24h. Le milieu est changé la veille de l'arrêt. Les agrégats sont lysés en présence de Trizol (Life Technologies) et de trois billes d'inox (Qiagen) sous agitation (Retsch MM300) pendant deux minutes à 22 battements par minute. Les ARN totaux sont ensuite extraits selon le protocole du fabricant : la phase aqueuse contenant les ARN est séparée de la phase organique contenant les protéines par extraction liquide-liquide au chloroforme. Puis les ARN sont précipités par de l'isopropanol, lavés à l'éthanol et remis en solution dans de l'eau stérile sans RNase.

La concentration est déterminée en mesurant l'absorbance des échantillons à 260nm au Nanodrop, ainsi que la présence de contaminants tels que les protéines et les solvants par le rapport de l'absorbance à 260nm sur l'absorbance à 280nm et 230nm respectivement. Ensuite l'intégrité des ARN est vérifiée sur gel d'agarose 1% dans du Tris-acétate-EDTA 1X (TAE, Biorad), contenant du bromure d'éthidium (BET, Quantum Bioprobe), sous une lampe à UV, en se basant sur l'intégrité des bandes 28S et 18S correspondant aux ARN des sous-unités ribosomales, qui sont exprimées de manière ubiquitaire et constante.

L'analyse quantitative et semi-quantitative des ARN messagers des gènes cibles, est décrite en détails plus loin (Chapitres 3 et 4).

2. Les modèles de chondrocytes souris

2.1 Culture des chondrocytes

Les chondrocytes épiphysaires des os longs de souris sont mis en culture primaire et/ou en culture secondaire après trois passages.

Les genoux (plateau tibial et condyles fémoraux) et la tête fémorale sont prélevés chez des souriceaux Swiss (Janvier) âgés de 4 à 6 jours. Les tissus environnant le cartilage (muscles, os, tendons) sont retirés en conditions stériles et les morceaux de cartilage sont digérés par deux collagénases successives (Collagénase IA, Sigma®) à 0,3mg/mL dans du DMEM. Les deux digestions à la collagénase sont incubées pendant 45 minutes à 37°C sous 8% de CO₂. Une dernière digestion à la collagénase, à 0,05mg/mL dans du DMEM se déroule sur toute la nuit. Le lendemain, les cellules sont séparées des restes de déchets tissulaires (fibres musculaires, tendineuses...) par pipetages répétés. Une fois les déchets décantés, les cellules sont récupérées et séparées de la collagénase par centrifugation (5minutes à 1500 rpm). Elles sont ensuite comptées à la cellule de Malassez et ensemencées selon la densité requise par l'expérimentation.

Pour la culture primaire, les cellules sont ensemencées à environ 15 000 cellules/cm² dans des plaques 6 puits dans du DMEM 1g glucose, contenant du rouge de phénol, de la pénicilline et streptomycine (PS), du pyruvate et 10%SVF.

Pour la culture secondaire les chondrocytes de culture primaire sont trypsinés et remis en culture dans les mêmes conditions, puis trypsinés tous les 6 jours jusqu'au passage P3 où ils sont traités dans les mêmes conditions que la culture primaire.

2.2 Traitements et inductions

A J3 après l'ensemencement, le milieu est changé sur toute la nuit en milieu DMEM contenant de la PS, mais privé de rouge de phénol et de SVF. A J4, le milieu est changé de nouveau, en milieu privé d'antibiotiques, de rouge de phénol et de SVF. Les perturbateurs endocriniens (M2, Génistéine, BPA) sont ajoutés dans le milieu à ce moment, ainsi que le bFGF (Roche®) si besoin, à 10 ng/mL.

2.3 Extraction des ARN totaux

Pour les chondrocytes de souris, les ARN sont étudiés à différents temps après induction par le bFGF et/ou les PE. Les milieux sont retirés et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS sans calcium et sans magnésium. Les cellules sont ensuite lysées avec un tampon contenant du thyocyanate de guanidium, issu du kit d'extraction RNeasy Mini-kit de Qiagen (tampon RLT). L'extraction des ARN totaux se fait selon le protocole du fabricant : les ARN totaux sont précipités avec de l'éthanol à 70°C et fixés sur une colonne de silicates. Toute trace d'ADN génomique est éliminée grâce à une DNase RNase-free (Qiagen®). L'élution des ARN est faite avec de l'eau stérile RNase-free. La concentration et l'intégrité des ARN sont déterminées de la même manière que pour les cellules C1.

3. Rétro-transcription

500ng à 2µg d'ARN totaux sont mis en présence d'un mélange des quatre oligonucléotides (dNTP), d'amorces aléatoires et d'une rétro-transcriptase recombinante du virus de la leucémie murine de Moloney (kit High Capacity cDNA reverse transcriptase, Applied Biosystems®, USA) dans un tampon adapté. Le volume réactionnel est complété avec de l'eau stérile. L'ADN complémentaire est synthétisé pendant 2h à 37°C. La réaction est arrêtée par un chauffage de 5min à 85°C. Les produits de RT sont ensuite aliquotés à concentration initiale (10 à 40ng cDNA/µL) et conservés à -20°C.

4. Réaction de polymérisation en chaîne semi-quantitative (SQ-PCR)

La SQ-PCR permet dans un premier temps de savoir si le produit de PCR issu de la réaction des produits de RT avec les amorces choisies est unique et s'il ne contient pas d'autre amplicon parasite. Pour cela on compare après migration sur gel d'agarose la taille prévue de l'amplicon avec un marqueur de taille connue. La SQ-PCR dans notre cas a surtout permis d'amplifier et de distinguer les isoformes COL2A et COL2B, issus de l'épissage alternatif du gène *Col2a1*. En effet, il n'existe pas d'amorces permettant de discriminer les deux isoformes de COL2 en PCR quantitative en temps réel.

Pour engendrer la réaction, 10 à 40ng d'ADN complémentaire sont mis en présence d'une polymérase thermorésistante (Taq DNA-polymerase, Promega®), d'un mélange de dNTPs (Applied Biosystems®) et d'un couple d'amorces sens et antisens ciblant la zone du gène d'intérêt à amplifier. L'ADN complémentaire est alors dénaturé pendant 5 minutes à 96°C. La dénaturation, l'hybridation et l'élongation se font à des températures spécifiques, respectivement 30 secondes à 96°C, 30 secondes à 60°C, 45 secondes à 72°C. L'appareil utilisé est le GeneAmp PCR System 9700. Pour que la PCR soit considérée comme semi-quantitative, le nombre de cycles a été déterminé pour se situer sur la phase exponentielle d'amplification. Les produits de PCR sont ensuite migrés sur un gel d'agarose à 2% dans du TAE contenant du BET. Après environ 45 minutes de migration, les gels sont observés sous lampe à UV, numérisés et la densitométrie des bandes est réalisée grâce au logiciel ImageJ. Pour un même échantillon, la densitométrie d'une bande d'un gène d'intérêt est comparée à celle du gène de référence interne. Le gène de référence interne choisi est souvent un gène de ménage, comme un gène d'une protéine structurale ubiquitaire, non susceptible d'être affectée par les différents traitements et inductions que subissent les cellules. Dans notre cas il s'agit de la β 2-microglobuline, utilisée aussi pour la qRT-PCR.

5. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (qRT-PCR)

La PCR quantitative en temps réel repose sur le principe de la détection de la fluorescence émise par un agent intercalant de l'ADN (ici le SYBR Green) dont la fluorescence augmente lorsqu'il se lie à l'ADN double-brin. La quantification des amplicons est corrélée à la fixation du fluorophore sur l'ADN et se fait au fur et à mesure de leur synthèse.

Les amplicons sont formés au cours de trois phases caractérisées par des cycles thermiques de durée déterminée, similairement à la PCR semi-quantitative. La quantification des amplicons est exprimée en Ct (cycle seuil). Cette valeur est définie comme étant le nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur seuil où le signal d'émission de la fluorescence est significativement plus élevé que le bruit de fond.

Le signal du gène d'intérêt est normalisé par rapport à un gène de ménage, comme pour la SQ-PCR. Les résultats sont ensuite exprimés en rapport relatif entre le Ct de l'échantillon traité et le Ct de l'échantillon témoin.

Le calcul utilisé est le suivant :

$$\Delta Ct = Ct (\text{gène d'intérêt}) - Ct (\text{gène de référence})$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{échantillon traité}) - \Delta Ct (\text{témoin})$$

$$\text{Rapport relatif} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

La spécificité des amorces utilisées et une éventuelle contamination du produit de RT ou du réactif sont vérifiées grâce à la courbe de dissociation, caractérisée à la fin des cycles thermiques de l'amplification. De plus, une courbe de dilution est faite pour déterminer l'efficacité de la réaction dépendante des amorces en présence.

L'appareil utilisé est le thermocycleur ABI Prism 1900 HT couplé à un logiciel d'analyse SDS2.3 (Applied Biosystems®).

Pour engendrer la réaction, 10 à 40ng d'ADN complémentaire sont mis en présence d'un mélange réactionnel contenant un couple d'amorces sens et antisens ciblant la zone du gène d'intérêt à amplifier, et d'un mix ABsolute QPCR SYBR GREEN Mix (ABgene®) contenant les dNTPs, la polymérase thermorésistante ThermoStart DNA Polymerase et un intercalant de l'ADN fluorescent (SYBR Green). Le seuil de quantification est fixé à un Ct de 30 cycles.

Le choix des amorces spécifiques d'un gène s'effectue à partir des séquences d'ADNc figurant dans les bases de données nucléotidiques disponibles sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Les amorces mesurent entre 18 et 25 nucléotides et amplifient en moyenne une séquence d'environ 200 paires de bases, leur température d'hybridation est égale à 60°C. Les amorces sont créées à l'aide d'un logiciel Oligo Explorer 1.1 et vérifiées avec le logiciel BLAST. Les couples d'amorces sont choisis de part et d'autre d'un intron, pour éliminer la possibilité d'une éventuelle amplification à partir de l'ADN génomique contaminant.

Les séquences des oligonucléotides utilisés pour la PCR (semi-quantitative et quantitative en temps réel) figurent dans le tableau ci-dessous (tableau 2). La différence entre les oligonucléotides utilisés pour la qRT-PCR du Col2 1 (COL2 « total ») et la SQ-PCR permettant de discriminer les isoformes COL2A et COL2B est représentée dans la figure 22 suivante.

Nom du gène	séquences des brins sens (Up) et antisens (Lw)
<i>�2microglobuline (�MG)</i>	Up: 5' GGTCGCTTCAGTCGTCAG 3' Low: 5' GTTCGGCTTCCCATTCTC 3'
<i>Sox9</i>	Up: 5' AGGAAGTCGGTGAACG 3' Low: 5' TGAGATTGCCCAGAGTGC 3'
<i>Aggrecan</i>	Up: 5' CCGTCAGATACCCCATTG 3' Low: 5' CAGCCAGCATAGCACTTG 3'
<i>Col2�1</i> "total" (qRT-PCR)	Up: 5' TGGCTTAGGGCAGAGAGAG 3' Low: 5' GGTGGCAGAGTTTCAGGTC 3'
<i>Col10�1</i>	Up: 5' GCTAATGTTCTTGACCCTGG 3' Low: 5' GCCTTGTTCTCCTCTTACTGG 3'
<i>Col1�2</i>	Up: 5' AAGGAGAGAAGGGAACCAAAG 3' Low: 5' AGGGAAGCCAGTCATACCAG 3'
<i>Col2�1</i> (SQ-PCR)	Up: 5' CGCTGGTGCTGCTGAC 3' Low: 5' CCTTTCTGCCCCCTTTGC 3'

Tableau 2. Liste des oligonucl tides utilisés pour l'amplification en SQ-PCR et en qRT-PCR

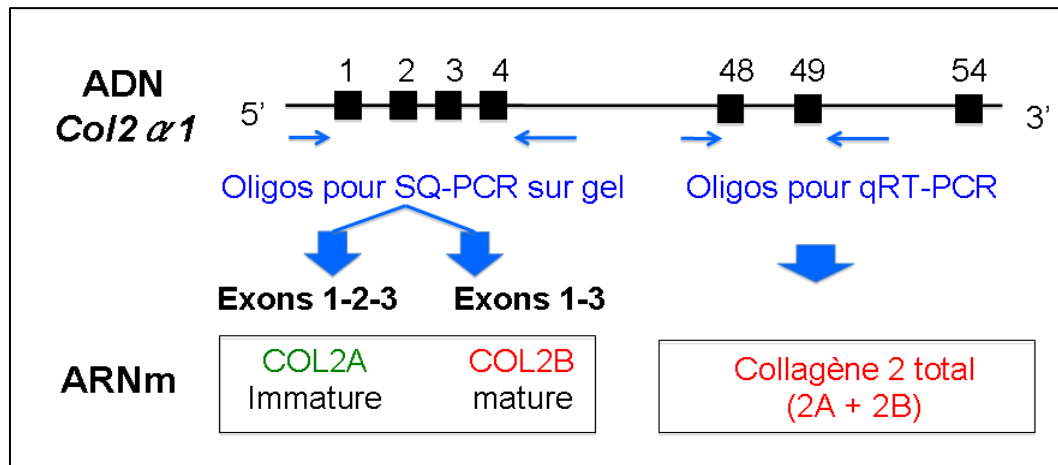


Figure 22 : Choix des oligonucléotides pour amplifier l'expression du collagène de type 2. A gauche, les oligonucléotides sont choisis pour amplifier spécifiquement les deux isoformes COL2A et COL2B, qui sont discriminées par migration sur gel d'agarose 2%. A droite, les oligonucléotides sont choisis pour amplifier le COL2 « total », qui ne permet pas la discrimination des deux isoformes.

6. Etude de l'expression des protéines d'intérêt

6.1 Extraction des protéines totales

Après la fin du traitement, les cellules sont rincées sur la glace deux fois avec du PBS 1X sans calcium et sans magnésium (Invitrogen®) contenant un cocktail d'inhibiteurs de métalloprotéases puis grattées dans du tampon de lyse (HEPES, 20mM ; NaCl 25mM ; EDTA 1mM ; NP40 0,2% ; glycérol 10% ; DTT 1mM ; Inhibiteur de protéases 1X). La réaction de lyse se fait sur la glace pendant vingt minutes, puis les cellules sont soniquées dans la glace afin d'assurer la lyse complète des cellules. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 14 000 rpm. Le surnageant est prélevé car il contient les protéines totales et le culot les déchets membranaires. Un aliquot est conservé pour dosage des protéines. Le reste est aliquoté et conservé à -80°C.

6.2. Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée selon la technique colorimétrique de Bradford, au bleu de Coomassie. Ce composé présente une absorbance initiale de 465 nm qui passe à 595 nm lorsqu'il est lié aux protéines. Le changement d'absorbance à 595 nm se manifeste par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés des protéines. Ce changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon. Une gamme est réalisée à partir d'une solution d'albumine bovine (BSA) à 2 mg/ml. La concentration protéique des échantillons est établie par la mesure de la DO (densité optique) à 595 nm grâce à un lecteur de microplaque (spectrophotomètre Power Wave Bio-Tek) et calculé par rapport à la gamme de BSA de concentration connue.

6.3. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse selon la méthode de Laemmli, en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (contenant du laurylsulfate de sodium), autrement dit SDS-PAGE.

Pour chaque échantillon à analyser, une quantité de 15-30 µg de protéines est complétée avec du tampon (tampon de charge NuPAGE, βmercapto-éthanol 5%, eau). Le mélange est porté à 70°C pendant 5 minutes, afin de dénaturer les protéines avant le dépôt sur gel.

Le type de gel (avec un gradient 4-12% de polyacrylamide NuPAGE® Novex Bis-Tris, Invitrogen®) et le tampon de migration (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer, Invitrogen) sont choisis en fonction de la taille de la protéine d'intérêt selon les indications de fournisseur (Invitrogen®).

Les échantillons ainsi que le marqueur de taille moléculaire (HiMark® Prestained protein Standard, Invitrogen®) sont déposés sur le gel et l'électrophorèse est réalisée pendant 50 à 60 min à 200V, jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bord inférieur du gel.

6.4 Transfert des protéines

Le transfert des protéines se fait sur une membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert (NuPAGE Transfer Buffer, Invitrogen®) pendant 1h30 avec un voltage constant de 30V. La membrane et le gel sont préalablement placés entre plusieurs feuilles de papier Whatman imbibés de tampon de transfert.

La qualité de transfert est vérifiée par la coloration de gel et celle de la migration et du transfert par la coloration de la membrane.

Coloration du gel

A la fin de la migration, le gel est démoulé et trempé pendant 30 min dans un colorant (bleu de Coomassie 0,05%, éthanol 25%, acide acétique 8%). Cela permet de visualiser les bandes, indiquant s'il reste des protéines sur le gel.

Coloration de la membrane

Les protéines de membrane sont colorées de manière non-spécifique par la solution de Rouge Ponceau (Rouge Ponceau 0,1 %, acide acétique 1%). Cette coloration a l'avantage d'être

réversible (décoloration dans l'eau) et permet de vérifier la qualité du dépôt des protéines (homogénéité, qualité de la migration).

6.5. Caractérisation des protéines d'intérêt par immunoblot

La membrane est incubée pendant 2h à température ambiante dans un tampon de saturation (PBS 1X sans calcium et sans magnésium, lait écrémé 5%, Tween-20 0,1%), puis une nuit à 4°C et sous agitation avec l'anticorps primaire spécifique dilué dans un tampon PBS 1X-5% lait écrémé-Tween 20 0,1%. Les anticorps primaires utilisés sont :

- anti-Sox9 (sc 17340, 1/200^e, chèvre anti-souris, Santa Cruz)
- anti-COL2A (AO815, 1/1000^e, lapin anti-humain, don de L. Sandell)
- actine (sc 1615, 1/1000^e, chèvre anti-souris, Santa Cruz)

Après rinçage (3 x 15minutes dans du tampon PBS 1X, lait 5%, Tween-20 0,1%), la membrane est incubée 1h sous agitation à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxydase du raifort (HRP, Horse-Radish Peroxydase) et dilué dans le même tampon que précédemment. Les anticorps secondaires utilisés sont :

- pour COL2A : anticorps anti-lapin fait chez la chèvre (sc2305, 1/20 000^e, Santa Cruz)
- pour l'actine : anticorps anti-chèvre fait chez l'âne (sc2020, 1/20 000^e, Santa Cruz)

Après lavage, la membrane est trempée dans un mélange de réactifs de "détection améliorée de la chimioluminescence" ECL (Enhanced ChemiLuminescence ; Amersham ECL™, GE Healthcare). La révélation est faite en chambre noire en mettant en contact avec un film (Amersham ECL™ Hyperfilm, GE Healthcare) pendant différents temps d'exposition. Les intensités lumineuses des protéines d'intérêt sont rapportées aux intensités correspondant à la protéine de référence β -actine (anti- β -actine, sc-1615, Santa Cruz).

Pour la détection de Sox9, une technique particulière a été utilisée, s'appuyant sur le matériel de détection et de lecture des membranes Odyssey®. Le tampon de blocage est fourni par le constructeur (LI-COR Biosciences, France) et sert à la dilution des anticorps. Le changement majeur par rapport à la technique énoncée ci-dessus réside dans l'emploi d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome IR-dye et visible par excitation grâce au logiciel du

constructeur. L'anticorps utilisé est un anticorps dirigé contre la chèvre, fait chez l'âne et couplé à un fluorochrome vert, dilué au 1/15 000^e dans du tampon de blocage Odyssey® contenant du Tween 20 à 0,2% et du SDS à 0,02%. L'incubation se fait dans l'obscurité pendant 1h à température ambiante. La révélation se fait par scan de la membrane.

7. Transfection transitoire des chondrocytes

Afin de déterminer si l'augmentation observée de COL2A en présence de bFGF est sous la dépendance de la protéine TIA-1, les cellules ont été transfectées de manière transitoire avec un si-RNA dirigé contre TIA-1.

Le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle par des ARN interférents a été découvert pour la première fois chez le nématode (*Caenorhabditis elegans*). Certains ARN interfèrent avec leur séquence homologue d'ARN messagers entraînant la dégradation de ce dernier. Ces petits ARN interférents (small interfering RNA ou siRNA) sont maintenant utilisés en routine *in vitro*, dans de nombreux types cellulaires.

Les siRNA double brins de 20 paires de bases, dessinés par la société Eurogentec selon notre demande ciblent les fragments spécifiques de la séquence du ARNm de TIA-1 de souris. Les chondrocytes ont été transfectés avec ces siRNA grâce au transfectant HiPerfect (Qiagen®).

Lors de la culture primaire, les chondrocytes sontensemencés à environ 7000 cellules/cm² dans des plaques de culture 6 puits, dans du DMEM 1g glucose PS 10%SVF. A J3 au soir le milieu est renouvelé pour amorcer une nouvelle division cellulaire. Le lendemain, le milieu est renouvelé de nouveau. Un mélange réactionnel de 112 µL par puits est préparé au préalable ; il contient le si-RNA, le transfectant HiPerfect et du DMEM sans PS ni SVF pour ajuster le volume. Le précipité se forme durant 15 minutes à température ambiante, et est additionné ensuite au milieu des cellules. Au bout de 12 heures une autre transfection similaire est effectuée, en DMEM sans rouge de phénol et sans sérum. Après 12 heures de cette seconde transfection, le milieu est changé de nouveau et les inductions sont effectuées comme à l'accoutumée.

Les séquences sens et antisens du Si-RNA utilisé dirigé contre TIA-1 figurent dans le tableau 3 ci-après.

Nature du brin	Séquence
si-TIA-1 sens	(GUUCUGUUGUAAAGCAUUAU)
si-TIA-1 antisens	(AUAUGCUUUACAACAGAAC)

Tableau 3. Séquences des brins sens et anti-sens des siRNA dirigés contre TIA-1 lors de la transfection transitoire.

8. Immunocytochimie

8.1 Cartilage de souris

8.1.1. Préparation des échantillons

Des pattes de souriceau nouveau-né sont recueillies durant la dissection. La peau est ôtée et les pattes sont mises dans le PFA-PBS à 4% pour la fixation, pendant 2 jours. Les échantillons sont ensuite rincés, placés dans une cassette et décalcifiés par bains successifs dans le décalcifiant DC1 (Labonord), à température ambiante.

S'ensuit une autre étape de fixation de 24h dans du LMR (équivalent du Toluène, LaboModerne) qui va précéder l'étape d'inclusion dans la paraffine.

8.1.2. Inclusion dans la paraffine

Les cassettes contenant les échantillons sont placées dans différents bains à 56°C pour être progressivement incluses dans la paraffine (Paraplast DMSO, Labonord) :

- 1^{er} bain de 30 min dans un mélange de LMR 50% et paraffine 50% ;
- 4 autres bains de paraffine qui sont changés tous les jours, avant inclusion dans un bloc de paraffine propre, qui va être conservé à 4°C au moins 24h.

Les blocs sont ensuite coupés par coupes sériées de 5µm et placées sur des lames SuperFrost® Gold (LaboModerne).

8.1.3. Marquage des lames

Les lames sont au préalable déparaffinées grâce à un bain de LMR, suivi d'un bain d'éthanol absolu et d'un rinçage à l'eau. Les coupes sont ensuite prêtes à être traitées et marquées.

Les échantillons sont localisés et séparés par un traçage au stylo hydrophobe (Dako Pen, Dako France). Ils subissent ensuite une digestion à la hyaluronidase (Sigma) à 2mg/mL dans du PBS avec calcium et magnésium pendant 1h à 37°C en atmosphère humide. Une fois la digestion terminée, les échantillons sont rincés dans du PBS avec calcium et magnésium 5 minutes deux fois.

Le blocage se fait par la suite lors d'une incubation de 30 min à température ambiante, avec une solution de BSA 5% et glycine 0,3 M dans du PBS pour saturer les sites non spécifiques. L'incubation avec un anticorps anti-COL2A dilué au 400^{ème}, et un anticorps anti-COL2A,B dilué au 1/100^e dans une solution PBS-BSA 1% se fait à la température ambiante pendant 2h ou à 4°C toute la nuit. Les cellules sont rincées trois fois par PBS-Tween 20 0,1% et incubées à l'obscurité pendant 2 h à la température ambiante avec un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre le lapin pour le COL2A, couplé à un fluorochrome vert et dilué au 1/1500^{ème}, et avec un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre la souris pour le COL2A,B couplé à un fluorochrome rouge et dilué également au 1/1500^e. Après trois lavages au PBS-Tween 20 0,1%, les lamelles sont fixées sur les lames avec un milieu anti-extinction de fluorescence (ProLong® Gold Slow Fade reagent with DAPI, Life Technologies).

8.2 Cellules C1

8.2.1 Préparation des lames

Les cellules sontensemencées, cultivées, induites selon les conditions citées plus haut. A l'arrêt, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS sans calcium ni magnésium. Les agrégats sont ensuite fixés au paraformaldéhyde 4% pendant une nuit. Par la suite, ils sont ensuite centrifugés 1 minute à 500 rpm pour être culottées. Pendant ce temps, on prépare de l'agarose dont le point de fusion est bas (Agarose NuSieve®, Tebu Bio, France) à 4% dans du PBS sans calcium ni magnésium, afin d'y inclure les cellules. Cet agarose est chauffé au bain-marie à 37°C. Une petite quantité de l'agarose est prélevé pour former un coussin d'agarose dans un tube eppendorf, puis mis à refroidir dans la glace. Les agrégats en culot sont eux-mêmes repris dans de l'agarose chaud et déposés sur le coussin d'agarose froid, les tubes sont

immédiatement centrifugés pour faire descendre les agrégats dans l'agarose, et remis dans la glace. La carotte d'agarose contenant les agrégats est ensuite découpée et délogée du tube au scalpel puis mise dans plusieurs bains de déshydratation.

Les carottes sont ensuite mises dans des béciers contenant une paraffine dont le point de fusion est bas, et préparée la veille comme suit :

- Polyéthylène glycol distéarate (Sigma) : 100g
- 1-Hexadécanol (Sigma) : 1g

Quatre bains de 20, 30, 60 min et d'une nuit sont effectués avant d'inclure les carottes d'agrégats dans une cassette de paraffine. Cette cassette est conservée à 4°C et dans la glace au moment de la coupe. Les coupes sont des coupes sériées de 5µm d'épaisseur qui sont déposées sur des lames SuperFrost® Gold (LaboModerne).

8.2.2. Marquage des lames

Dans un premier temps, les lames sont déparaffinées par des bains successifs de réhydratation. Les échantillons sont localisés et séparés par un traçage au stylo hydrophobe (Dako Pen, Dako France). Ils subissent ensuite une digestion à la hyaluronidase (Sigma) à 2mg/mL dans du PBS avec calcium et magnésium pendant 1h à 37°C en atmosphère humide. Une fois la digestion terminée, les échantillons sont rincés dans du PBS avec calcium et magnésium. Ils sont ensuite bloqués et marqués comme les pattes de souris nouveau-né (voir chapitre 8.1).

La localisation des épitopes reconnus par les différents anticorps sont schématisés dans la figure qui suit.

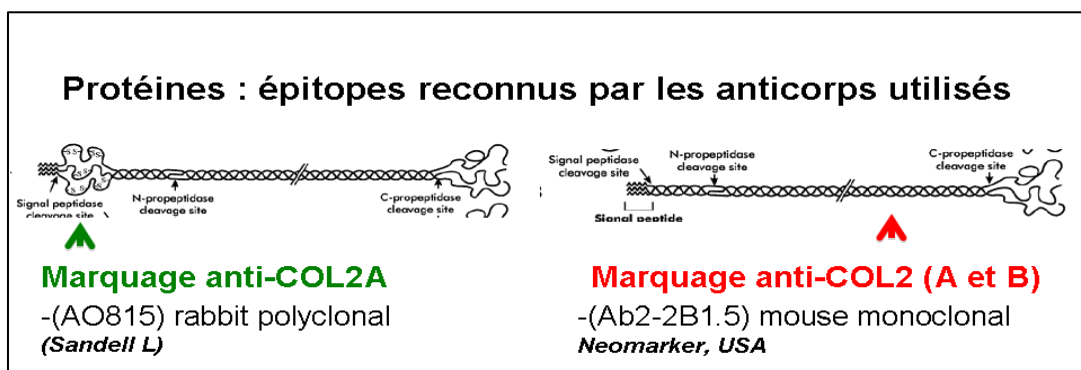


Figure 23. Localisation des épitopes reconnus par les anticorps utilisés pour discriminer l'isoforme COL2A. A gauche, l'anticorps est dirigé contre le domaine N-propeptide de COL2A spécifiquement. A droite, l'anticorps est dirigé contre la triple-hélice du collagène.

9. Statistiques

Les résultats représentent la moyenne \pm erreur standard de la moyenne (S.E.M.) de n expérimentations. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R version 3.0.1 (<http://www.r-project.org/>). Les différences statistiques entre les groupes d'expérience ont été analysées par test de Kruskal-Wallis. Les résultats sont considérés significatifs pour $p < 0,05$.

Première partie : Résultats *in vivo*

Dans cette première partie, nous allons vous présenter les effets *in vivo* d'une exposition foetale aux perturbateurs endocriniens, qui se poursuit jusqu'à la lactation ou jusqu'à l'âge adulte (article soumis, en révision).

Nous avons voulu connaître l'impact des doses inférieures au NOAEL (No Observed Adverse Effect Level, ou dose où il n'y a plus d'effet indésirable observé) de la vinclozoline (V), un fongicide anti-androgénique, seul ou associé à des xénestrogènes (génistéine, G, et bisphénol A, BPA). V, G, BPA et leurs associations ont été administrés *per os* à des ratte pendant la gestation et la lactation. Les générations F1 et F2 ont été analysées, à la recherche d'anomalies squelettiques aux jours post-nataux 30, 110 (J30, J110). Le développement squelettique a été contrôlé en mesurant les dimensions des vertèbres caudales et des os longs par micro-CT Scan à rayons X.

Une augmentation significative de la distance entre les deux apophyses transverses (ITA, Inter Transverse Apophysis) au niveau supérieure des vertèbres caudales a été observée chez les femelles F1 traitées, accompagnées d'une réduction de la longueur du corps vertébral. Cette augmentation n'a pas été observée chez les mâles.

L'analyse histologique de la plaque de croissance cartilagineuse des corps vertébraux a été réalisée sur des coupes sériées de vertèbres caudales. Les femelles F1, mais pas les mâles, montrent une diminution de l'épaisseur de la plaque de croissance, avec un impact plus important sur la zone hypertrophique. Tous les effets observés sont à leur maximum à J30. Les effets sur la largeur de l'ITA persistent jusqu'à J110 alors que les effets sur la plaque de croissance disparaissent. Ces effets sont essentiellement liés à la présence de vinclozoline ou de BPA. Les animaux de la génération F2 ne sont pas affectés. Nos données suggèrent que la vinclozoline et les xénestrogènes agissent comme des perturbateurs du développement du cartilage. Les valeurs actuelles des doses NOAEL pour ces molécules ne sont pas pertinentes pour des expositions gestationnelles et devraient être reconsidérées pour des cibles spécifiques. Finalement, le micro CT-Scan apparaît comme une technique non invasive très utile pour détecter les effets de PE sur la faune vivante.

I. RESULTATS

Nous reportons ici les données de deux études séquentielles tendant à déterminer la toxicité des PE (V, G, BPA) dans le développement squelettique du rongeur sur deux générations (F1, F2). Des ratte Wistar ont été exposées à la vinclozoline seule ou en combinaison avec la génistéine ou le bisphénol-A, pendant la gestation et la lactation ou l'âge adulte, à des doses inférieures au NOAEL. Les générations suivantes ont analysées pour déterminer les impacts des PE à J30 ou J110 après la naissance.

1. Poids corporel des animaux

Le traitement par vinclozoline et génistéine à 1 mg/kg/jour (GV1) a provoqué une perte de poids ($6 \pm 1\%$) chez les femelles F0 dans l'étude CIME. La différence mineure observée par rapport aux femelles témoins était significative à $p < 0,05$, mais aucun autre traitement n'a été montré de différence et les poids des générations F1 et F2 n'ont pas montré de variations (figure 24).

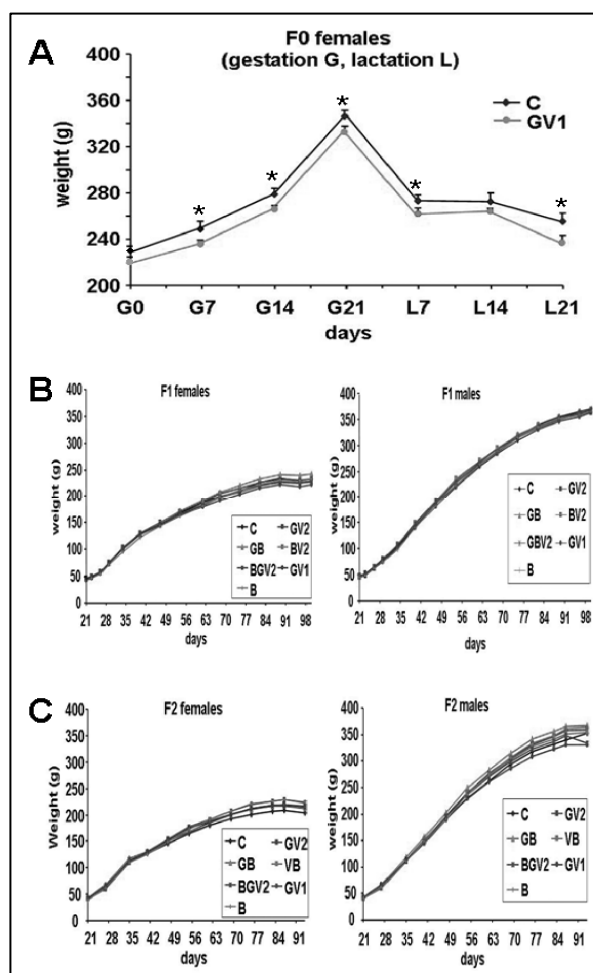


Figure 24 Graphiques des poids des animaux témoins comparés aux animaux traités.

A. Mères gestantes en F0. Les mesures sont prises pendant la période d'exposition comprenant la gestation (G) et la lactation (L).
B. Génération F1 et C. Génération F2. Les mesures ont été prises du sevrage (J21) jusqu'au sacrifice à J110. Echantillons (n = 15 rats par condition). * = $p < 0.05$.

2. Modifications anatomiques des vertèbres

Nous avons recherché la nature de ces déformations de la queue par analyse au micro-CT-scan. Les scans n'ont pas montré d'anomalie majeure au sein du rachis ou des membres (non montré). Les os longs (tibia et fémur) n'ont pas montré de modification significative dans les animaux exposés comparés aux témoins (non montré). En parallèle, une augmentation significative de la distance (largeur) entre les apophyses transverses (I.T.A.) de la tête supérieure des vertèbres a été observée à J30 dans les femelles F1 traitées avec la combinaison GV1 et à J110 dans les combinaisons GV1, GV2 et BGV2 (figure 25 A et B).

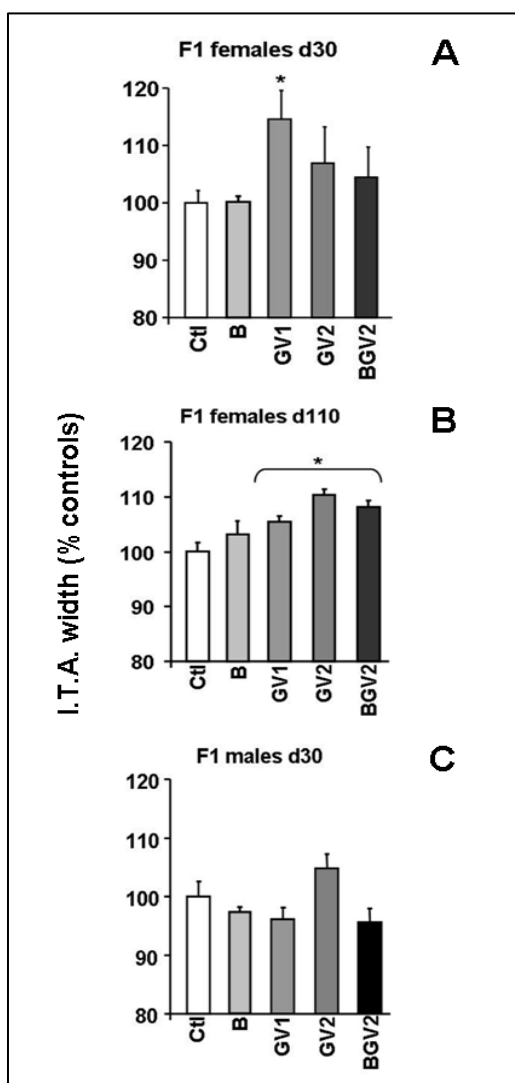


Figure 25. Analyse de la distance entre les apophyses transverses (I.T.A.) par micro-CT-Scan. **A.** Femelles F1 à J30. **B.** Femelles F1 à J110. **C.** Mâles F1 à J30. Les données sont exprimées en % des animaux témoins. Témoins (Ctl), BPA 5µg/kg/jour (B), génistéine 1mg/kg/jour (G), vinclozoline 1mg/kg/jour (V1), génistéine+vinclozoline 1mg/kg/jour (GV1), génistéine 1mg/kg/jour + vinclozoline 10µg/kg/jour (GV2), BPA 5µg/kg/jour + génistéine 1mg/kg/jour + vinclozoline 10µg/kg/jour (BGV2) (n=4). * : p<0,05.

Cet élargissement est associé à une réduction de la longueur vertébrale (longueur cumulée de v5 à v8) observée chez les femelles F1 à J30 (figure 26A). Tous les effets atteignent leur maximum à J30 et dépendent essentiellement de la présence de V dans le traitement. Les effets sur la largeur ITA persiste jusqu'à J110 alors que les effets sur la longueur disparaissent (comparaison des figures 25 et 26, A et B). Le BPA tend à supplanter l'effet de V dans la plupart des combinaisons (comparaison des figures 25 et 26 panneau A). Il n'y a pas d'effet chez les mâles F1 (comparaison figures 25 et 26, panneau C). Nous n'avons pas tenu des mâles à un temps plus tardif J110). Aucun des PE n'affecte les animaux en F2 dans les deux sexes, quelque soit la combinaison (non montré).

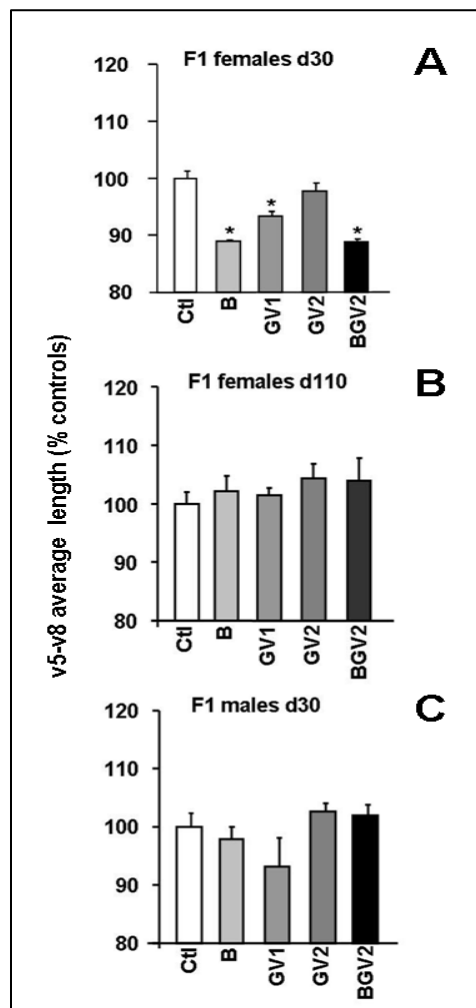


Figure 26. Analyse par micro-CT-Scan de la longueur cumulée des vertèbres (v5-v8). A. Femelles F1 à J30. B. Femelles F1 à J110. C. Mâles F1 à J30. Les données sont exprimées en % des animaux témoins. Témoins (Ctl), BPA 5µg/kg/jour (B), génistéine 1mg/kg/jour (G), vinclozoline 1mg/kg/jour (V1), génistéine+vinclozoline 1mg/kg/jour (GV1), génistéine 1mg/kg/jour + vinclozoline 10µg/kg/jour (GV2), BPA 5µg/kg/jour + génistéine 1mg/kg/jour + vinclozoline 10µg/kg/jour (BGV2) (n=4). * : p<0,05.

3. Analyse histométrique des vertèbres

L'analyse histométrique des vertèbres a été effectuée sur des coupes sériées de 5µm à partir d'une coupe longitudinale médiane dans la région des vertèbres v5-v8, colorée au trichrome de Masson. La plaque de croissance du cartilage (GP) a pu être visualisée au niveau du corps vertébral aussi bien qu'au niveau de l'apophyse transverse correspondante. La figure 27A montre une image typique du disque intervertébral (IVD), du corps vertébral (V), et de la distance ITA (flèche gauche). Nous n'avons pas pu faire d'analyse histométrique de la distance ITA au sein de la plaque de croissance car sa forme sphérique ne permet pas l'obtention d'une séquence uniforme de coupes sériées planes (figure 27, flèche gauche noire). Nous nous sommes donc centrés ensuite sur le raccourcissement du corps vertébral associé. La figure 27B (femelles F1 témoins à J30) et 27C (femelles F1 témoins à J100) montre l'épaisseur de la plaque de croissance vertébrale, avec les délimitations de la plaque de croissance totale (A, A'), de la zone proliférative (B) et de la zone hypertrophique (C). La largeur de l'IVD et la longueur ne sont pas modifiées par l'exposition aux PE (données non montrées). Dans les conditions témoins, l'épaisseur de la plaque de croissance cartilagineuses décroît significativement entre J30 et J110 : de 0,3 mm à 0,1 mm (-67%) chez les femelles et de 0,275 mm à 0,150 mm (-45%) chez les mâles. Les femelles F1 traitées montrent une réduction plus importante de l'épaisseur de la plaque de croissance vertébrale à J30 comparées aux témoins (figure 28A) ; Cette diminution de la plaque de croissance est observée dans la zone proliférative ($-12 \pm 0,5\%$) mais n'est pas plus prononcée dans la zone hypertrophique ($-29 \pm 0,5\%$), suggérant une accélération de la maturation du cartilage de la plaque de croissance. Cette réduction de la plaque de croissance est observée sous l'influence de G et V à 1mg/kg/jour seuls ou en combinaison (G, V1, GV1). La combinaison GV1 n'a pas d'effet additif ou synergique. Les mâles F1 ne sont pas affectés à J30 (figure 28B).

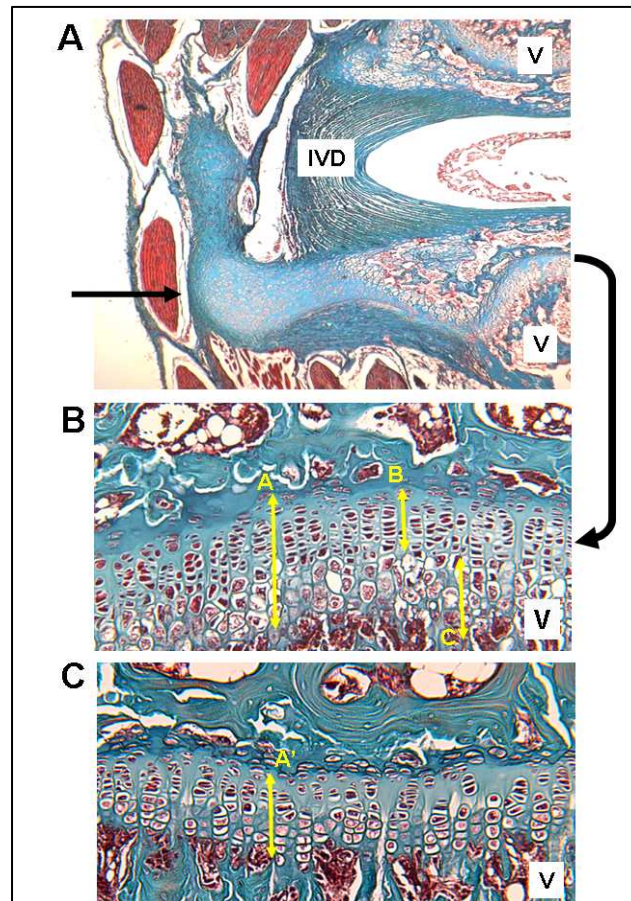


Figure 27. Morphologie histologique d’une section du rachis caudal dans la région v5-v8. **A.** la section transverse deux corps vertébraux (V) et le disque intervertébral (IVD). La flèche noire à gauche pointe l’apophyse transverse cartilagineuse gauche. La flèche noire à droite part de la plaque de croissance vertébrale (GP) et pointe à une image élargie de cette plaque de croissance. **B.** Section transversale typique d’une plaque de croissance vertébrale témoin à J30, montrant le protocole de mesure (flèche : (A) plaque de croissance dans sa totalité, (B) zone proliférative, (C) zone hypertrophique). **C.** Section transversale typique d’une plaque de croissance vertébrale témoin à J110 (flèche : (A’) plaque de croissance dans sa totalité).

Pour surmonter l'insensibilité des mâles de la génération F1, une expérience avec une combinaison plus estrogénique a été effectuée. Les mères F0 ont été exposées au BPA seul ou combiné avec les autres PE ; les données des petits mâles à J30 sont montrées dans la figure 28C. Les expositions étaient les suivantes : BPA seul, 5 $\mu\text{g/kg/jour}$, (10 à 20 fois inférieur au NOAEL), BPA + génistéine (1 mg/kg/jour) (G + BPA), BPA + vinclozoline (10 $\mu\text{g/kg/jour}$) (V2 + BPA) ou la combinaison entière (GV2 + BPA). Sous ces conditions, les mâles F1 à J30 ont montré une diminution globale des zones proliférative et hypertrophiques après exposition aux combinaisons contenant le BPA, avec un effet neutralisant inattendu de la condition BGV2 (figure 28C).

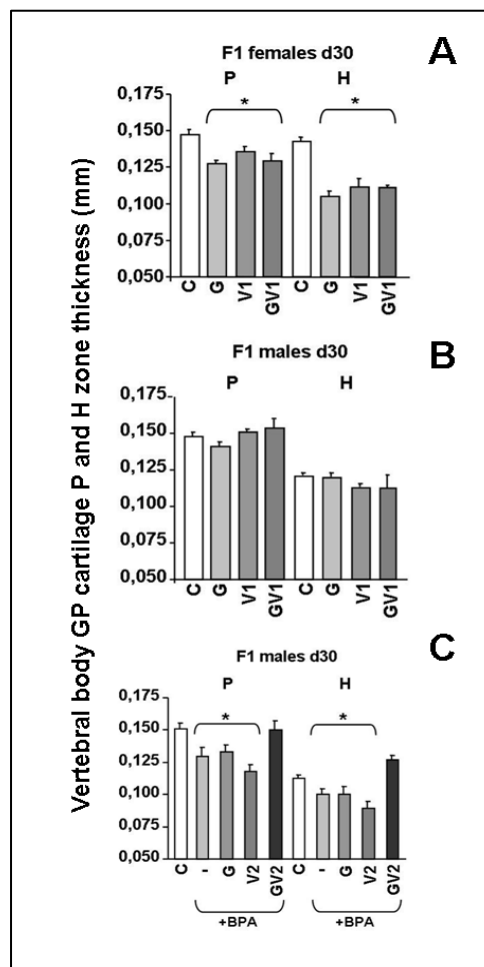


Figure 28. Mesure histométrique de l'épaisseur de la plaque de croissance (GP) du corps vertébral, de la zone proliférative (P) et de la zone hypertrophique (H) (exprimées en mm). **A.** Femelles F1 à J30 ; **B.** Mâles F1 à J30. Témoins (C), génistéine 1 mg/kg/jour (G), vinclozoline 1mg/kg/jour (V1), génistéine+vinclozoline 1mg/kg/jour (GV1). **C.** Expérience de combinaisons contenant le BPA ; BPA 5 $\mu\text{g/kg/jour}$ a été ajouté seul (-) ou en combinaison avec la génistéine 1 mg/kg/jour (G), la vinclozoline 10 $\mu\text{g/kg/jour}$ (V2), et avec la combinaison GV2. (n=4 rats par condition). * : p< 0,05

Finalement, la figure 29A montre que les femelles F1 adultes de l'étude sub-NOAEL ne maintiennent pas à J110 l'effet global visible à J30 (figure 28A). La réduction de la plaque de croissance persiste sous vinclozoline seule (V1). Les mâles adultes (J110) ont été insensibles encore une fois aux PE (figure 29B) et il en est de même pour les animaux de la génération F2 (non montré).

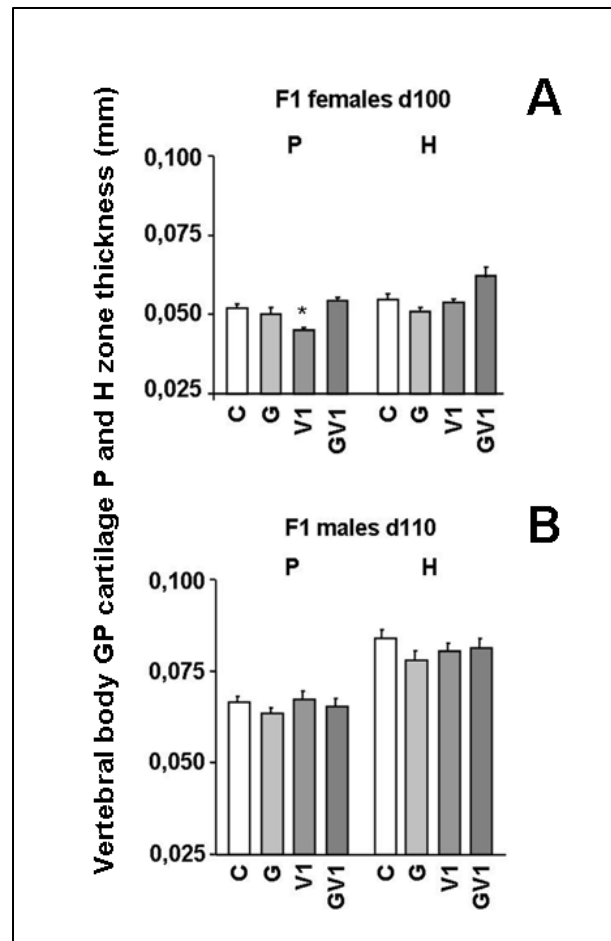


Figure 29 : Analyse histométrique de l'épaisseur de de la plaque de croissance (GP) du corps vertébral, de la zone proliférative (P) et de la zone hypertrophique (H) (exprimées en mm). A. Femelles F1 à J100. B. Mâles F1 à J110. Témoins (C), génistéine 1 mg/kg/jour (G), vinclozoline 1mg/kg/jour (V1), génistéine+vinclozoline 1mg/kg/jour (GV1).(n=4 rats par condition). * : p<0,05.

II. CONCLUSION ET DISCUSSION

Ce travail présente l'originalité d'une exposition de femelles pendant la gestation puis la lactation à des doses inférieures au NOAEL pour chaque composé. Peu d'études ont jusqu'à présent utilisé ce mode d'exposition qui devient de plus en plus un mode « prototypique ». Ces expositions ont montré des effets sur la croissance du cartilage de la descendance des animaux exposés, aussi bien au niveau anatomique qu'au niveau histologique. Pour la génistéine (G), une dose 100 fois inférieure au NOAEL a été utilisée, tandis que les doses de vinclozoline (V1, V2) sont 12 à 1200 fois inférieures au NOAEL respectivement, et que la dose de bisphénol A (B, BPA) est 1 à 4 fois inférieure au NOAEL. Nous avons sélectionné deux doses de vinclozoline, la première dose, 1mg/kg/jour correspondant à la dose de référence d'une étude précédente concernant la fertilité (Eustache et al., 2009) ; la seconde dose, 10µg/kg/jour, représente une dose intermédiaire entre la dose NOAEL proposée par l'USEPA qui est de 1,2 mg/kg/jour (<https://federalregister.gov/a/03-7246>) et le niveau de contamination alimentaire par les résidus de vinclozoline pour l'homme (apport journalier de 3,3µg/kg en France selon (Leblanc et al., 2005)). Pour la génistéine, la dose de 1mg/kg/jour est la même que dans les travaux d'Eustache (Eustache et al., 2009). Ces doses de V et G permettent de vérifier l'homogénéité de nos études avec les travaux sur le tractus génital mâles cité plus haut.

Vinclozoline et génistéine à 1mg/kg/jour (GV1) montrent une perte de poids ($6 \pm 1\%$) des femelles gestantes de la génération F0 appartenant à l'étude CIME. Bien que ces valeurs pour l'exposition au mélange GV1 soient significativement différentes des valeurs témoins, la différence est mineure. Nous ne pouvons pas exclure une variabilité subtile dans l'hébergement des animaux et dans les conditions de fécondation, ni donner une conclusion définitive à ce résultat.

L'observation initiale des anomalies de la queue par palpation ont révélé des élargissements sagittaux récurrents de la queue (queues « cannelées ») chez les animaux traités, essentiellement chez les femelles exposées à la vinclozoline. L'étude au micro-CT-Scan montre que ces cannelures correspondent aux élargissements des ITA à chaque vertèbre caudale. De manière surprenante, l'élargissement de l'ITA est associé avec le raccourcissement du corps vertébral. Ces anomalies apparaissent sous l'exposition à la

vinclozoline, seul ou combiné aux xénestrogènes, chez les femelles de génération F1 à J30, mais pas chez les mâles. Les anomalies persistent après la cessation de l'exposition (femelles J110 ; GV1, GV2, BGV2) pour l'élargissement de l'ITA mais pas pour le raccourcissement vertébral (figures 25, 26). La génération F2 ne montre pas d'effet. Ces résultats sont en désaccord avec les effets transgénérationnels de la vinclozoline ayant pour cible exclusive les mâles, décrits précédemment (Anway et al., 2006). Les choses ne sont en fait pas si simples, la vinclozoline à 1mg/kg/jour ayant montré des modifications sur le ratio de longueur des doigts dans une expérimentation sur la génération F2 (Auger et al., 2013). La vinclozoline exerce à la fois de véritables effets estrogéniques et anti-androgéniques par l'intermédiaire de son métabolite M2, alors que la génistéine et le BPA sont des xénestrogènes, mais détiennent également d'autres propriétés. La génistéine inhibe les tyrosine-kinases (Akiyama et al., 1987) alors que le BPA a pour cible les isoformes de la protéine kinase C (Tan et al., 2013). Ces composés peuvent être vus comme des accélérateurs de la sénescence du cartilage et de la fusion épiphysaire chez les mammifères (Börjesson et al., 2013), sur la même ligne que l'action de l'estradiol dans les deux sexes (Morishima et al., 1995; Smith et al., 1994).

L'analyse histologique soutient notre interprétation d'un effet estrogénique, puisque les PE utilisés ici diminuent dans son ensemble la plaque de croissance avec un effet plus prononcé sur la zone hypertrophique que sur la zone proliférative, et exclusivement chez les femelles (voir figure 28, panneaux A et B). Quand l'impact « estrogénique » des expositions est renforcé par l'addition du BPA, il se produit un effet sur les mâles de la génération F1 à J30 (figure 28C). En soutien additionnel, un article récent où la génistéine a été donnée à des rattees à 50mg/kg/jour (dose comparable au NOAEL), montre une diminution significative de l'épaisseur du cartilage condyalaire mandibulaire (Yu et al., 2012). Les effets de ces PE sont significatifs, puisque l'effet de la vinclozoline et/ou des xénestrogènes sur le développement de la plaque de croissance à des doses inférieure au NOAEL est comparable quantitativement en intensité (10 à 50% de modification) aux modifications du cartilage induites par une invalidation du récepteur aux estrogènes α (ER α) chez la souris comme cela a été décrit par le groupe de Börjesson (Börjesson et al., 2012, 2010).

La croissance des vertèbres se produit par un processus d'ossification endochondrale « asynchrone », à partir de plusieurs centres d'ossification. Les centres primaires d'ossification se forment de manière précoce dans le corps vertébral (6-8^e semaine de l'embryon) alors que les centres d'ossification secondaires apparaissent dans les processus

épineux et transverse (ITA) plus tard, et grandissent jusqu'à la puberté (Bareggi et al., 1993; Burbidge et al., 1995; Dias, 2007). Nous proposons que les PE accélèrent la maturation du cartilage dans les ITA et les corps vertébraux. De nombreuses hypothèses peuvent expliquer l'apparent contraste entre l'élargissement de l'ITA et le raccourcissement du corps vertébral, et leur persistance différentielle dans le temps.

Tout d'abord, dû à la maturation plus précoce de la plaque de croissance du cartilage des corps vertébraux, en comparaison avec celui des ITA, les PE pourraient induire un vieillissement précoce de la plaque de croissance des corps vertébraux en même temps qu'ils augmentent la prolifération de l'ITA. Le rachis ne montre pas d'autres anomalies en dehors de la région caudale. Cela pourrait être aussi dû à une différence chronologique de la croissance vertébrale. La plaque de croissance cartilagineuse mature dans les vertèbres thoraciques avant les vertèbres caudales et cervicales, menant à un effet différentiel de la fenêtre d'exposition. Dans les animaux témoins, notre observation d'une différence liée au sexe au niveau de l'épaisseur de la plaque de croissance est en accord avec le retard de maturation classique de cette plaque de croissance des rongeurs mâles, bien que ce retard reste controversé chez les humains (Szpinda et al., 2013).

Deuxièmement, les effets de la vinclozoline et des xénostrogènes pourraient être reliés plus directement aux récepteurs aux estrogènes (ER) et/ou à la capacité connue des ligands des ER d'engendrer des réponses différentielles dans des voies variées de signalisation médiées par ER. Par exemple, la transactivation de la région AF-1 dans ER α est capable de recruter des corépresseurs au lieu de coactivateurs dans le cartilage des rongeurs (Börjesson et al., 2012, 2010). La vinclozoline et les xénostrogènes pourraient mener à ce recrutement différentiel. Ce mécanisme serait dépendant du pool disponible de cofacteurs dans une sous-population donnée de chondrocytes, capable de varier pendant la maturation du cartilage de l'ITA et de la plaque de croissance du corps vertébral. L'impact différentiel des expositions pourrait aussi être dépendant d'une fenêtre de temps, relié à l'apparition chronologique des différentes voies de signalisation de ER dans les chondrocytes en développement (ER $\alpha\beta$, GPR30, ER associé à la cavéoline avec implication de p38) (Boyan and Schwartz, 2004; Sylvia et al., 2000).

En plus des effets estrogéniques de la génistéine et du BPA, la vinclozoline pourrait combiner son propre effet estrogénique avec l'effet anti-androgénique de son métabolite M2.

ER α , ER β , et le récepteur aux androgènes (AR) sont plus abondamment exprimés dans la zone proliférative que dans la zone hypertrophique (60% vs 40%) et leur expression est constante (Nilsson et al., 2003). La capacité de liaison spécifique de l'estradiol à la membrane, incluant le récepteur GPR30, est présent dans les chondrocytes hypertrophiques et l'expression de GPR30 diminue au cours de la puberté (Chagin and Särendahl, 2007; Sylvia et al., 1998). Ainsi, l'effet sur la zone hypertrophique qui disparaît chez les femelles adultes de la génération F1, à J110, pourrait être lié à la catégorie de ER lié à membrane plutôt qu'aux ER nucléaires (figures 28A, 29A).

Deuxième Partie, Résultats *in vitro* (1) : Effets des PE sur un modèle d'induction chondrogénique

I. RESULTATS

1. Effets de G, V et sur l'induction chondrogénique précoce dans le modèle C1.

Pour explorer les effets des perturbateurs endocriniens sur la chondrogenèse *in vitro*, nous avons utilisé la dynamique de différenciation chondrogénique précoce observable dans le modèle de cellules murines pluripotentes C1. En présence de Dexaméthasone (DEX) et en milieu sans sérum, ces cellules s'engagent dans la voie de différenciation chondrogénique de façon exclusive. Ces conditions expérimentales permettent de s'affranchir de nombreux facteurs que l'on trouve dans les milieux chondrogéniques « classiques » (sérum, mélange insulín-transferrine-selenium, facteurs de croissance) et d'éviter des interférences qui pourraient en découler pour déterminer l'effet des PE.

Protocoles évènementiels du modèle C1.

Le modèle C1 tel qu'il a été défini par les auteurs est représenté tableau 4.

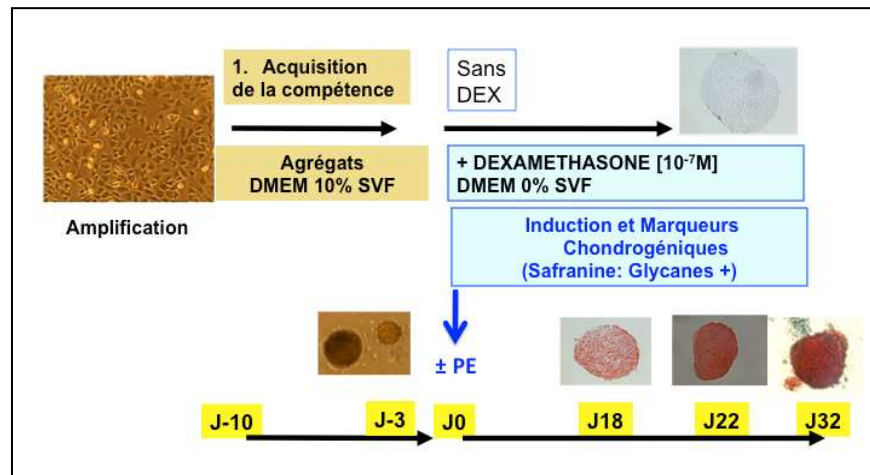


Tableau 4. Les différentes étapes de l'induction chondrogénique dans le modèle C1 (Cellules mésoblastiques multipotentes dérivées d'un carcinome embryonnaire murin immortalisé, (*Locker et al., 2004; Poliard et al., 1999*). Le protocole détaillé est décrit dans les méthodes. Pendant la phase de compétence (J-10 à J0), les cellules forment des agrégats et acquièrent la capacité à se différencier. La phase de recrutement (J0 à J30) en présence de dexaméthasone (DEX) et en milieu sans sérum, correspond à une augmentation brutale de l'expression de Sox9 par les cellules puis par l'acquisition du phénotype chondrocytaire (COL2 et agrécane). Ces protéines matricielles encore immatures sont secrétées mais ne s'assemblent pas dans le milieu extracellulaire avant J18-J22 comme le montre la coloration safranine, signe de la présence de protéoglycanes néosynthétisés. Cette expression augmente ensuite en fonction du temps, devient pérécellulaire (J22-J32) et peut même se calcifier après J32. Les PE ont été ajoutés ou pas à J0 ainsi qu'à chaque changement de milieu jusqu'à J32. Les ARN totaux et les protéines ont été extraits des agrégats à des temps différents entre J0 et J32 en prenant comme référence les extraits d'agrégats à J-3.

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de la génistéine (G), de la vinclozoline (V) et de son métabolite M2 sur les phases successives de différenciation chondrogénique, après l'induction DEX-dépendante des agrégats C1 : expression de SOX9 de COL2, d'agrécane, et de COL10 (Tableau 5). Dans un deuxième temps nous avons centré notre étude sur les effets du métabolite M2, le plus actif des effecteurs étudiés, sur l'expression différentielle des deux isoformes de collagène 2, COL2A et COL2B.

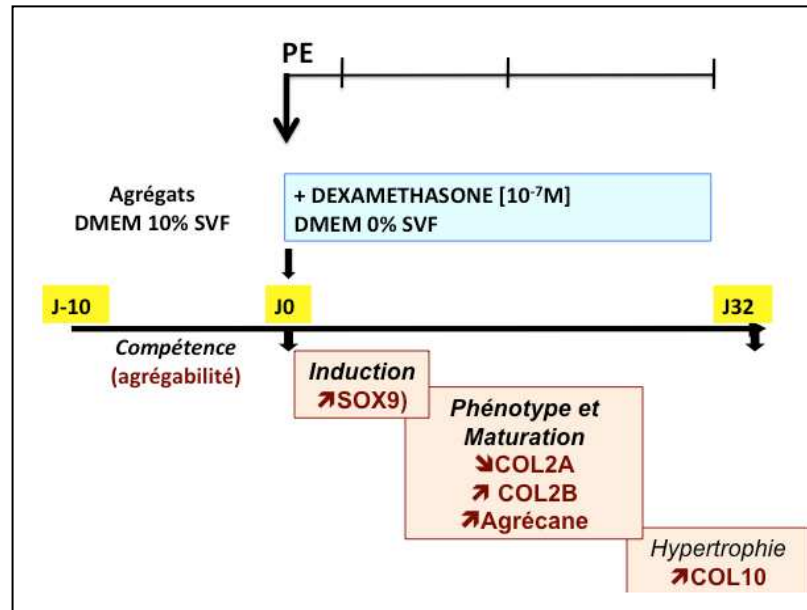


Tableau 5. Protocole expérimental des effets des PE. Les PE ont été ajoutés aux cellules à des temps différents de façon à étudier leurs effets à trois phases successives de différenciation sur les marqueurs : Sox9, COL2A, COL2B, Agrécane, COL10.

2. Les PE n'ont pas d'effet sur l'augmentation de l'expression de Sox9 induite par la DEX.

Les doses des PE ont été choisies en fonction de leur affinité théorique pour les récepteurs des hormones stéroïdes, cibles essentielles des molécules étudiées. Nous avons aussi repris des données antérieures du laboratoire qui montraient que l'estradiol était actif à $[10^{-8}\text{M}]$ sur des chondrocytes en culture. La génistéine étant 100 fois moins affine que l'estradiol pour les RE, nous avons fixé les doses d'exploration de $[10^{-9}\text{M}]$ à $[10^{-6}\text{M}]$. Par souci d'homogénéité, la dose exploratoire de vinclozoline et de M2 a été fixée à la même valeur.

L'induction chondrogénique se caractérise par l'augmentation d'un facteur 2 de l'expression de Sox9 dans les 48h qui suivent la privation de sérum et l'addition de dexaméthasone. Comme le montre la figure 30A, l'addition de M2, quelle que soit la concentration, ne modifie pas ce profil d'expression. Au niveau protéique (Figure 30B), Sox9 se caractérise par un signal de poids moléculaire (PM) apparent d'environ 61 kDa, similaire au signal observé à partir de chondrocytes de souris en culture primaire. Avant induction chondrogénique à J-3, deux signaux sont fortement exprimés, respectivement à un PM

apparent de 61 kDa (SOX9) et 99 Kda (SOX6). A J4, l'expression de SOX6 est à la limite de la détection alors que SOX9 est bien exprimé. L'addition ou non de M2 ne modifie pas ce signal. En présence d'un antagoniste des glucocorticoïdes, la Mifépristone, l'expression de SOX9 diminue d'environ 30%, en absence et en présence de M2 (Figure 30C). Ces données confirment le caractère DEX-dépendant de l'induction chondrogénique et montrent l'inactivité de M2 sur ce processus. Des données similaires ont été obtenues avec G et V à $[10^{-6}\text{M}]$.

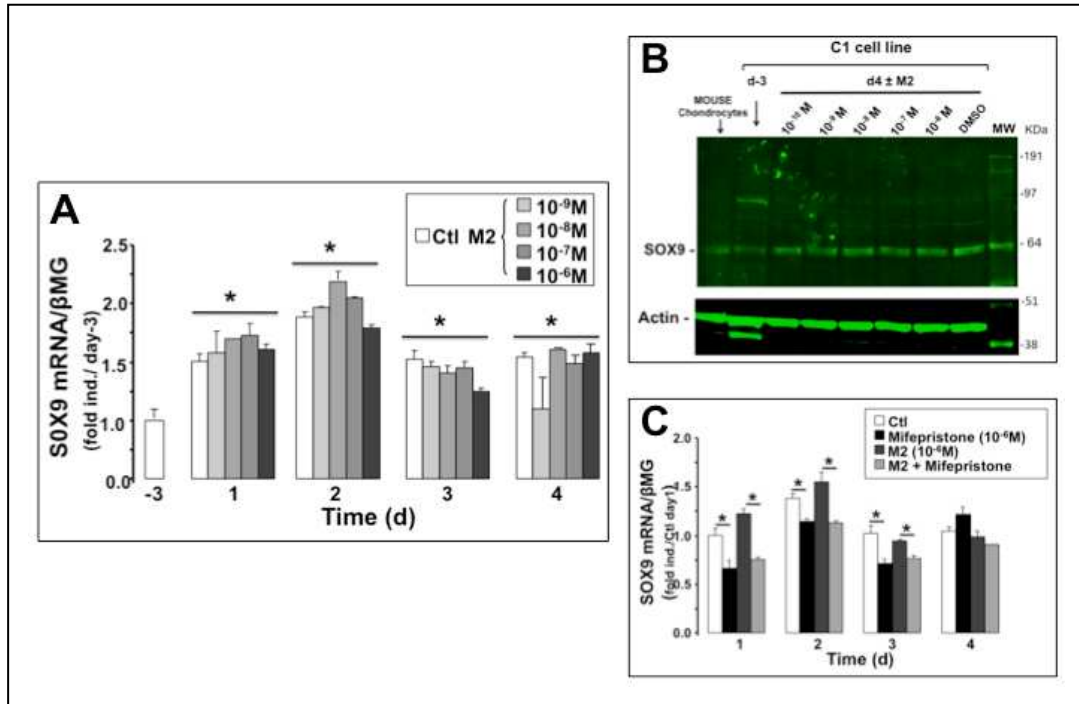


Figure 30. Effets du M2 sur l'expression de SOX9 après induction chondrogénique des cellules C1. Les agrégats de cellules C1 ont été incubés ou non en présence de doses différentes de M2 de J0 à J4. Les ARN totaux et les protéines ont été extraits à J1, J2, J3 et J4 et comparés aux agrégats de J-3 pris comme référence intra-assay. **A. Quantification des ARNm de SOX9 par q-RT-PCR.** *= $p < 0.05$ / d-3, $n = 4$. Données représentatives de 3 expériences séparées. **B. Expression de la protéine SOX9 par western blot,** dans les agrégats de J4, traitées ou non par M2 à doses différentes. En haut expression de SOX9 : ligne 1 : extrait protéique de chondrocytes de souris en culture pour l'identification du signal de SOX9 de souris ; ligne 2 : agrégats à J-3 ; lignes 3-7 : agrégats traités avec M2 ; ligne 8 : agrégats contrôles; ligne 9 : marqueur de poids moléculaire. En bas, expression de l'actine comme contrôle de dépôt. **C. Effets d'un inhibiteur du récepteur aux glucocorticoïdes, la mifépristone, sur les transcrits de SOX9** dans les agrégats traités ou non par $[10^{-6}\text{M}]$ de M2. *= $p < 0.05$ / contrôle, $n = 3$. Données représentatives de 3 expériences séparées.

3. Effets des PE sur les marqueurs phénotypiques des agrégats chondrogéniques DEX-induits.

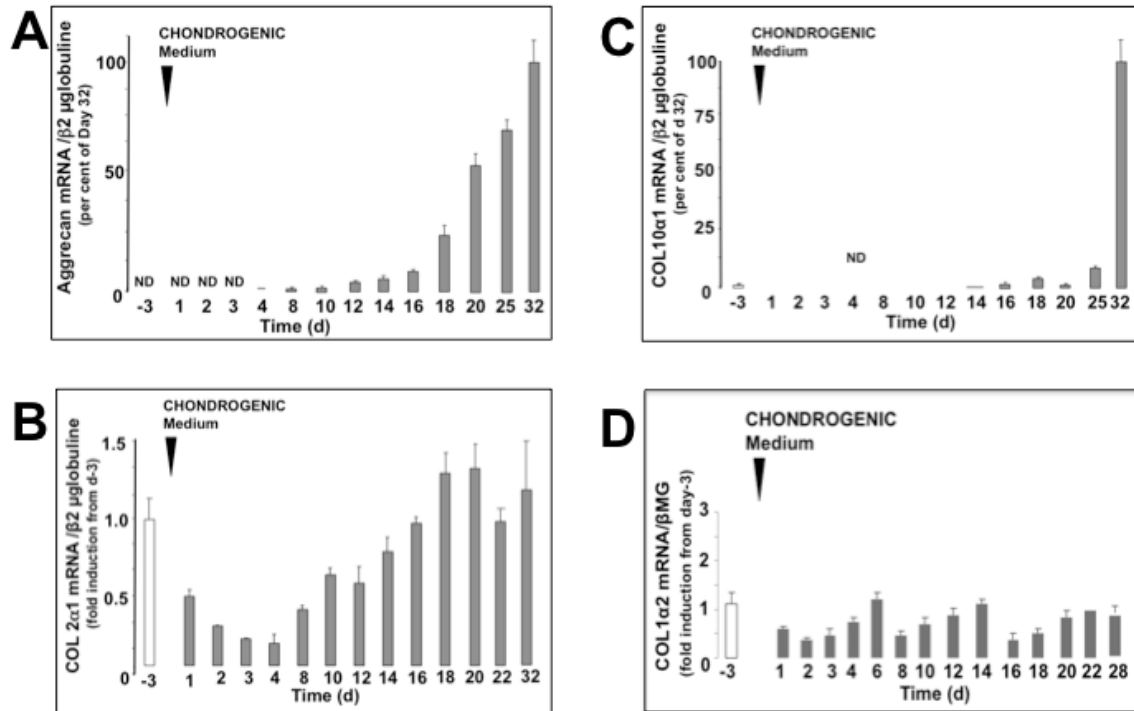


Figure 31. Expression des transcrits de marqueurs chondrogéniques (A,B,C) et non chondrogénique (D) en fonction du temps, dans les agrégats DEX-induits et en conditions basales sans effecteurs. Les agrégats sont mis en culture comme décrit dans méthode. A J0, ils sont mis en milieu chondrogénique « sans sérum et avec Dex [10^{-7} M] ». Les agrégats sont ensuite maintenus en culture à 37°C en normoxie avec 10% CO₂. Le milieu est changé tous les 3 jours. A chaque temps indiqué sur la figure, les ARN totaux sont extraits des agrégats et analysés par qRT-PCR pour les marqueurs phénotypiques, chacun étant rapporté à l'expression de la β2-microglobuline, prise comme marqueur interne. Chaque barre représente la moyenne ± SEM de 3 expériences différentes, chacune ayant été réalisée en triplicate. **A. Expression de l'agrécan.** Aucune expression n'étant détectée dans les premiers jours de culture (ND) les données observées à J32 sont prises comme référence = 100. Les jours intermédiaires sont en pour cent de J32. **B. Expression de COL2α1.** L'expression de transcrits de COL2α1 à J-3 est prise comme référence et les autres temps sont exprimés en niveau d'induction par rapport à J-3. **C. Expression des transcrits de Col10α1.** Le processus est le même que pour Col2α1 en A. **D. Expression des transcrits de Col1α2.** Le processus est le même que pour Col10α1 en B.

Nous avons ensuite étudié les effets de G, V et M2 sur l'expression des transcrits des principaux marqueurs phénotypiques : marqueurs chondrogéniques (agrécan, COL2 et COL10) ; marqueurs de dédifférenciation non spécifique (COL1), marqueurs adipogéniques (AP2, PPAR γ), et marqueurs ostéoblastiques (Runx2, Ostéocalcine).

Comme attendu dans ce modèle d'induction chondrogénique, l'expression des transcrits d'Agrécan n'est détectable qu'à partir de J10 –J12 et augmente ensuite régulièrement jusqu'à J32 (Figure 31A). En revanche la cinétique d'expression d'ARNm de COL2 commence par décroître de J-3 à J1, elle est minimale à J3-J4 puis augmente et atteint un maximum entre J18-J22 et reste en plateau jusqu'à J32 (Figure 31B). Les oligonucléotides utilisés en PCR quantitative, ne départagent pas les deux isoformes, COL2A et COL2B, qui seront analysées par PCR semi-quantitative plus loin. L'expression de COL10, marqueur de maturation chondrogénique et d'hypertrophie des chondrocytes, n'est pas significativement mesurable à J32. Les marqueurs de dédifférenciation sont à la limite de la détection et ne varient pas. Seule l'expression de COL1 est représentée par souci de simplification.

L'étape suivante été d'étudier l'effet de l'addition de G, V et M2 sur ces mêmes paramètres.

L'addition des PE ne modifie pas l'expression d'agrécan, ni de COL10, alors qu'une augmentation faible mais significative de COL2 est observée avec chacun des PE à J18 comme indiqué sur la figure 32B. Cette augmentation n'est plus observée à J32. Des expériences réalisées à des temps intermédiaires montrent un effet stimulant fluctuant entre J8 et J18, mais la dispersion des données d'une expérience à l'autre ne permet pas une bonne reproductibilité (données non montrées).

Les PE n'ont en revanche aucun effet sur les marqueurs non spécifiques. Seule l'expression de COL1 est représentée figure 32D. Des résultats similaires ont été obtenus avec Runx2, ostéocalcine, AP2 et PPAR γ .

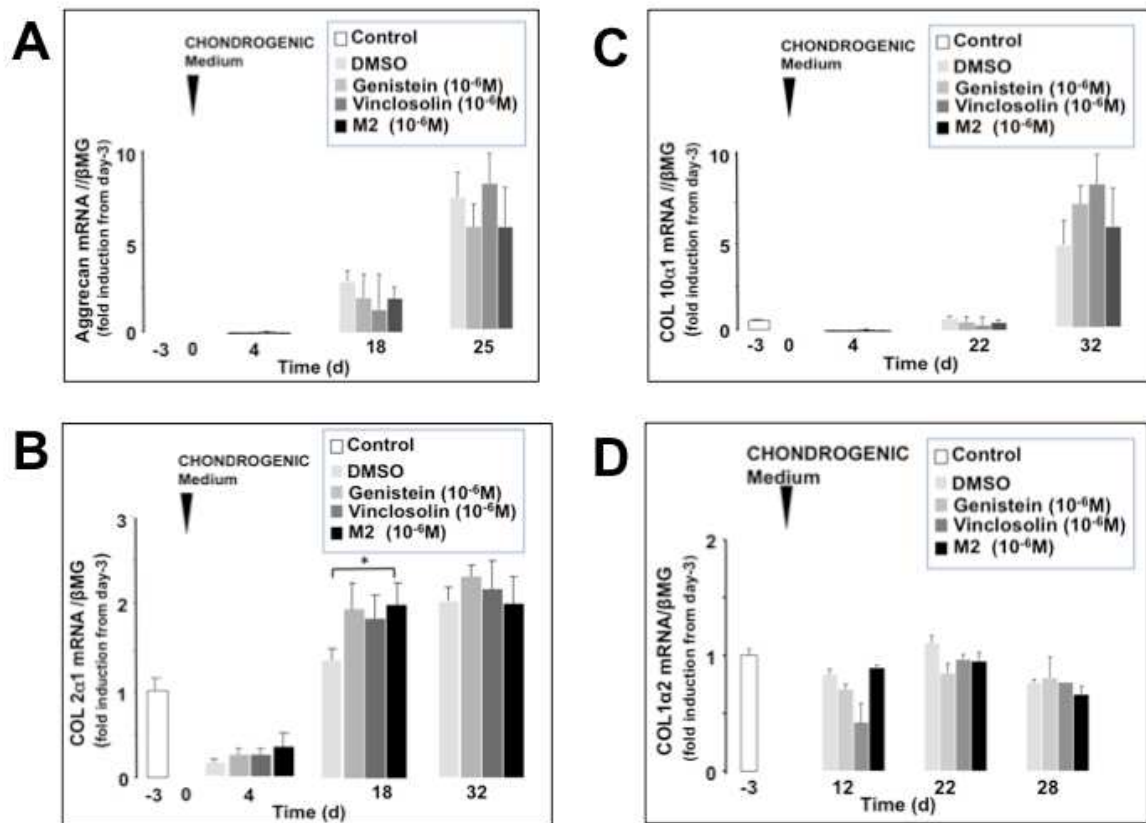


Figure 32. Effets de G, V et M2 à [10⁻⁶M] sur l'expression des marqueurs phénotypiques des agrégats DEX-induits. Les agrégats sont mis en culture comme décrit dans la figure précédente. Chaque effecteur est ajouté dans le milieu chondrogénique à J0 puis à chaque changement de milieu. A chaque temps indiqué les ARN totaux sont été extraits des agrégats et analysés par qRT-PCR comme dans la figure précédente. Chaque barre représente la moyenne ± SEM de 3 expériences différentes. **A. Effets des PE sur l'expression d'agrécan.** Analyse à J-3, J4, J18 et J25. **B Effets des PE sur l'expression de COL2.** Analyse à J-3, J4, J18 et J32. * p<0. 05 / DMSO. **C. Effets des PE sur l'expression de COL10.** Analyse à J-3, J4, J22 et J32. **D. Effets des PE sur l'expression de COL1.** Analyse à J-3, J12, J22, J28.

Nous avons émis l'hypothèse que les PE pouvaient modifier la cinétique de maturation de COL2 et l'expression différentielle de COL2A immature et COL2B mature.

4. Etude de l'expression différentielle de COL2A et de COL2B dans les agrégats en fonction du temps de culture.

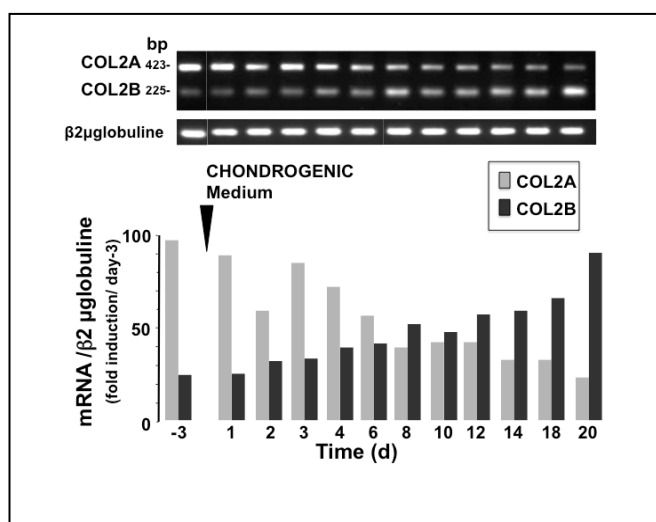


Figure 33. Expression des ARNm des isoformes COL2A et COL2B au cours de l'induction chondrogénique DEX-dépendante des agrégats C1. Analyse par RT-PCR semi-quantitative des transcrits COL2A et COL2B en fonction du temps dans les conditions basales. Les agrégats C1 sont mis en culture selon la technique décrite dans méthodes. A J0, les agrégats sont incubés dans un milieu sans sérum auquel on ajoute de la dexaméthasone. Les ARN totaux sont extraits à des temps successifs de J1 à J20. Pour différencier l'expression des isoformes proCOL2A et proCOL2B, l'amplification se fait en présence d'amorces choisies de manière à délimiter et amplifier la partie du gène qui nous intéresse, à savoir l'exon 2 : sens 5' CGCTGGTGCTGCTGAC 3' et antisens 5'CCTTTCTGCCCCTTTGG 3'. Les amorces de β2-microglobuline sont utilisées comme contrôle interne : sens 5'GGTCGCTTCAGTCGTCAG 3' et antisens 5' GTTCGGCTTCCATTCTC 3' : taille 142 bp. Après migration sur gel d'agarose, les signaux COL2A et de COL2B (423 et 225 paires de bases, respectivement) ainsi que le signal β2-microglobuline sont révélés par illumination aux UV (panneau du haut). A chaque temps étudié, la densitométrie de chaque signal COL2A et de chaque signal COL2B est rapportée à la mesure densitométrique de la bande de β2-μGlobuline correspondante puis exprimée en pourcentage et rapportée à J-3 et mis sous forme de graphique (panneau du bas). Cette figure est représentative de plus de 5 expériences séparées.

La protéine COL2 est codée par le gène *Col2α1* qui subit un épissage alternatif, donnant naissance à deux isoformes, le collagène 2A immature et le collagène 2B mature. Pour étudier l'expression différentielle des deux isoformes, nous avons utilisé des oligonucléotides encadrant l'exon 2 et analysé les produits d'amplification après électrophorèse (Figure 33). Dans les conditions basales de culture sans effecteurs, les transcrits de COL2A diminuent progressivement au cours du temps alors que l'expression de COL2B augmente, avec un switch COL2A / COL2B situés entre J6 et J10. Après J18 les transcrits de COL2B sont majoritaires et représentent environ $\frac{3}{4}$ de l'expression COL2A+COL2B.

Au niveau protéique, l'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre le propeptide N-terminal de COL2A permet d'analyser l'expression spécifique de cet isoformes alors que l'anticorps classique anti COL2, dirigé contre la triple hélice est commun aux deux isoformes. L'analyse de COL2A par western blot est présentée plus loin pour l'étude des effets de M2. L'analyse morphologique des agrégats par ICC n'est pas quantitative mais permet toutefois de confirmer la diminution progressive de COL2A au cours du temps dans les conditions basales.

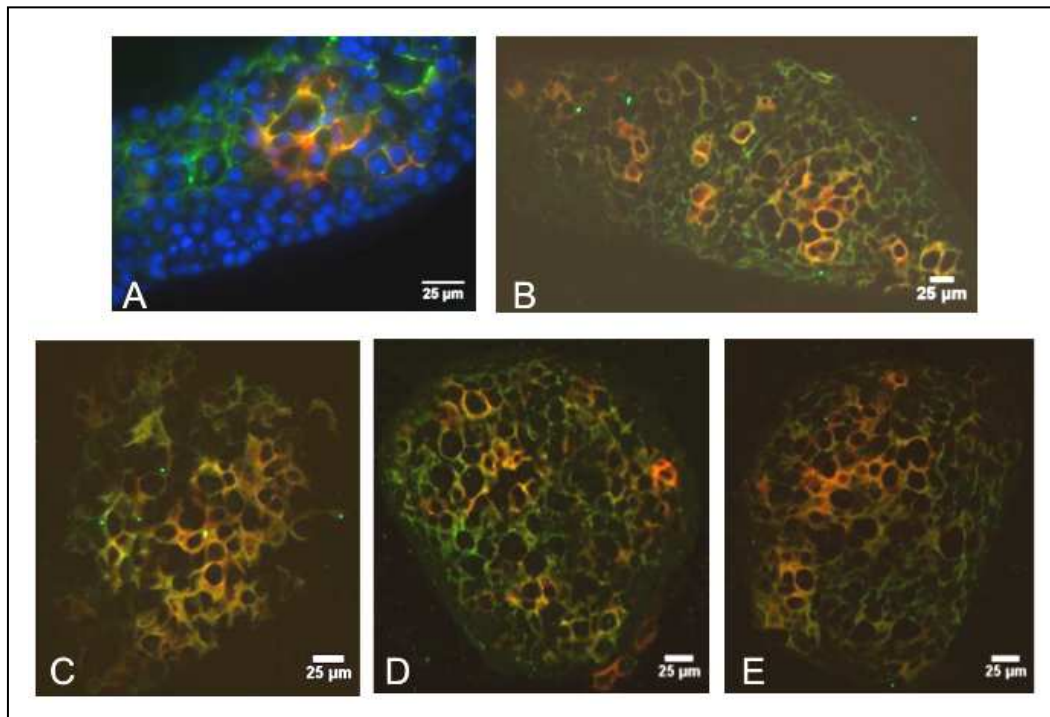


Figure 34. Localisation de COL2A par immunocytochimie (ICC) dans les agrégats Dex-induits entre J10 et J18. Les agrégats mis en culture dans les conditions basales, ont été recueillis à des temps différents, fixés et inclus dans la paraffine selon la technique décrite dans les méthodes. Le marquage est réalisé sur des coupes de 5 microns, en présence d'un anticorps anti-COL2A spécifiquement dirigé contre le propeptide N-terminal de COL2A (fluorescence verte), et d'un anticorps anti-COL2 dirigé contre la triple hélice commune aux deux isoformes (fluorescence rouge). Chaque photo représente le merge des deux signaux. **A. Exemple d'un agrégat à J10 avec marquage au Dapi pour la coloration des noyaux. B,C,D. Agrégat à J12. E. Agrégat à J18 (E).**

La figure 34 montre que la protéine COL2A est majoritairement exprimée autour des cellules jusqu'à J18 (Figure 34A). Les zones périphériques des agrégats sont positives pour l'anti-COL2A spécifique seul (fluorescence verte) alors que plus on va vers le centre des agrégats plus on observe des clusters de double marquage anti-COL2A/ anti-COL2A+B (orange). Pour

un même agrégat plusieurs centres de maturation se forment simultanément (Fig 34 B, C, D, E). Après J20, les zones de marquage COL2A diminuent au profit des zones de double marquage orange (Figure 35A, B) et de marquage exclusivement rouge (Figure 35D). Ces données sont donc bien en faveur d'une disparition progressive de COL2A au cours du temps.

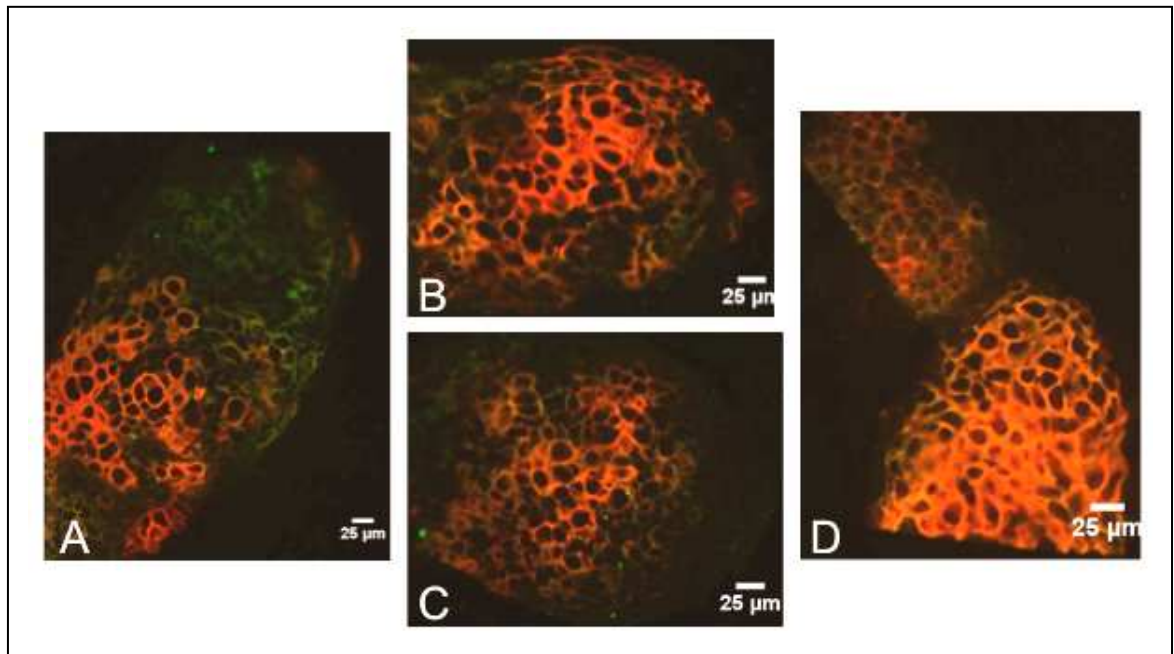


Figure 35. Localisation de COL2A par ICC dans les agrégats DEX-induits entre J22 et J32. Les agrégats sont traités de la même façon que dans la figure précédente, à J22 (A), J25 (B,C) et J32 (D).

5. Etude des effets de M2 sur l'expression de COL2A et COL2B .

Le métabolite M2 étant le plus actif des trois effecteurs étudiés, nous avons centré notre étude sur les effets de ce métabolite sur l'expression de COL2A et COL2B. Un effet-dose de M2 a été effectué à J12 et J22. Les résultats sont représentés sur la figure 36.

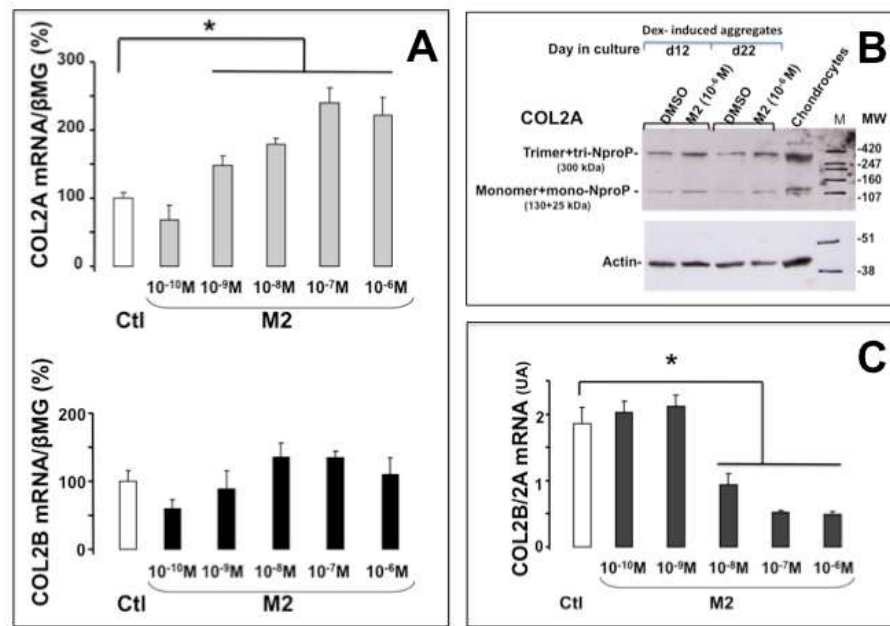


Figure 36. Effet de l'addition de M2 sur l'expression de COL2A et COL2B. Les agrégats sont incubés ou non avec M2 de J0 à J20, aux concentrations indiquées sur le graphe. Les ARN totaux ont été extraits et analysés au niveau ARNm et protéique. **A. Effet dose de l'addition de M2 à J12.** La quantification des ARNm a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative, comme décrit dans la figure 30. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM des valeurs obtenues à partir de 3 expériences séparées, chaque expérience étant réalisée en triplicate. **B. Analyse de la protéine COL2A par western blot.** Des extraits protéiques ont été extraits à J12 et J22 à partir d'agrégats témoins (DMSO) ou traités avec M2 [10⁻⁶M] et analysés par western blot avec un anticorps spécifique de COL2A, dirigé contre l'extrémité N terminale du peptide. Comparaison avec la migration de protéines extraites de chondrocytes de souris en culture au 2^{ème} passage (contrôle positif). L'actine est utilisée comme contrôle de dépôt. **C. Représentation graphique du rapport des transcrits de COL2B/COL2A à J12**

En présence de M2, le taux d'ARNm de COL2A est augmenté alors que celui de COL2B n'est pas modifié (Figure 36A). L'effet stimulant de M2 sur les transcrits de COL2A est faible mais significatif par rapport au contrôle. Il est dose-dépendant avec un maximum à [10⁻⁶M] (facteur x2). En revanche aucune modification significative de l'expression de COL2B n'est observée en présence de M2 quelle que soit la dose utilisée. Le rapport COL2B/COL2A (Figure 36C) signe donc le degré de maturation de COL2 à un temps donné et sera utilisé dans la suite du travail pour analyser plus finement les effets de M2 en fonction du temps.

L'analyse par western blot de la protéine COL2A (Figure 36B) montre que le trimère de COL2A est exprimé à J12 et J22, à un PM apparent d'environ 300 kDa, similaire à celui

de COL2A exprimé par les chondrocytes en culture au 2^{ème} passage (COL2A positives). La densité des signaux observés à J12 et J22, rapportée à la densité des signaux d'actine correspondants, est deux fois plus intense que les signaux contrôles (DMSO).

Bien que semi-quantitatives, ces données sont en faveur d'un effet stimulant de M2 sur la quantité de COL2A présent dans les agrégats, suggérant que M2 pourrait retarder la maturation de l'expression de collagène de type 2.

L'analyse par ICC a été réalisée sur deux fenêtres de temps, J18-J20 et J22-J25, en comptant une série de 100 agrégats dans chaque espace de temps. Les images de la figure 37 sont représentatives de cette étude et montrent qu'à chaque temps étudié, le réseau COL2A seul (vert) est plus largement présent dans les agrégats traités avec M2 que dans les contrôles.

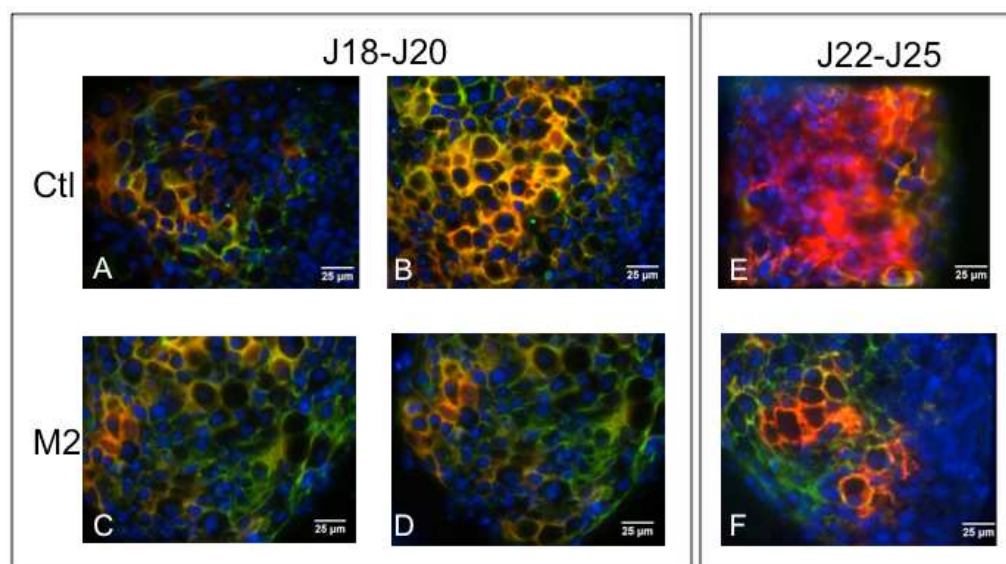


Figure 37. Effet du M2 sur l'expression de COL2A dans les agrégats DEX-induits au cours du temps. Les agrégats contrôles (A,B,E) ou traités avec M2 [10^{-6} M] (C,D,F) sont analysés par ICC avec les mêmes anticorps que la figures 33. Les noyaux sont colorés au Dapi. Les images sont représentatives de deux séries de 100 agrégats analysées : entre J18 et J20 (A,B,C,D) et entre J22 et J25 (E,F).

Un comptage du marquage des agrégats a été fait à J22 et J36 sur deux séries de 100 agrégats dans chaque condition (tableau 6). Le processus de différenciation et de maturation de COL2 est visualisé sur le nombre d'agrégats marqués versus le nombre total d'agrégats comptés et sur le marquage relatif de COL2A versus COL2A+B. Entre J22 et J32 on passe de 50% à 10% d'agrégats négatifs pour les contrôles comme pour les traités, ce qui confirme la progression majeure du processus de différenciation au niveau protéique à cette période.

L'addition de M2 induit une augmentation de l'expression de COL2A de presque 3 fois (28% vs 10%) par rapport aux contrôles. Cet effet est observé à J22 mais a disparu à J36 : aucune différence n'est observée entre les contrôles et les traités avec 2% à 4% d'agrégats marqués en vert et 80% à 83% marqués avec les deux anticorps. L'effet de M2 est donc transitoire et semble bien agir sur la vitesse de maturation de collagène 2.

Agrégats	J22		J36	
	Ctl (%)	M2 (%)	Ctl (%)	M2 (%)
Non marqués	51±8	49±6	13± 3	8±5
Anti COL2A (vert)	10±7	28±8	4±2	2
Anti COL2A+B) (orange et rouge)	39±8	23±8	83±5	80±6

Tableau 6. Comptage des agrégats spécifiquement marqués avec l'anticorps anti-COL2A à J22 et J36. Des coupes d'ICC d'agrégats à J22 et J36 sont analysées par comptage de deux champs de 100 agrégats pour chaque condition. Les nombres d'agrégats non marqués, marqués seulement en vert et marqués en orange et rouge sont rapportés au nombre total d'agrégats par champs. Pas d'analyse statistique (n=2)

6. Effet de l'hypoxie sur la vitesse d'induction chondrogénique dex-induite et sur les effets de M2.

Pour vérifier l'hypothèse d'une modification de la cinétique de maturation de COL2 par les PE, nous avons fait varier la vitesse de maturation chondrogénique des agrégats en les exposant à des conditions hypoxiques ($pO_2=1\%$) par comparaison avec les conditions habituelles de culture en normoxie ($pO_2=21\%$). L'hypoxie, plus proche des conditions physiologiques de chondrogenèse *in vivo* (gradient de $pO_2 < 10\%$), devrait accélérer le processus de maturation chondrogénique *in vitro*.

C'est ce qui est observé figure 38A et B.

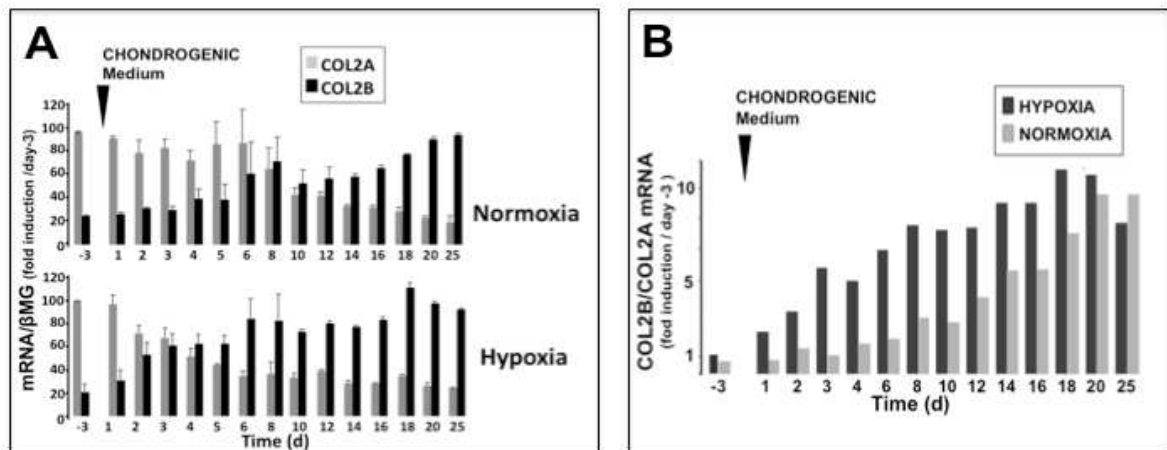


Figure 38. Rôle de l'hypoxie sur l'expression des ARNm de COL2A et COL2B par les agrégats Dex-induits dans la voie chondrogénique. A. Cinétique de COL2A et COL2B en fonction du temps de culture (J1-J25). A J0 les agrégats sont mis en culture selon la technique décrite dans méthodes, soit en normoxie ($pO_2 = 21\%$) (panneau du haut), soit en hypoxie ($pO_2 = 1\%$) (panneau du bas). Les ARN totaux sont extraits à des temps successifs de J1   J25 et analysés pour COL2A et COL2B par RT-PCR semi-quantitative comme décrit dans la fig 30. Pour chaque expérience, chaque signal est rapport  à J-3 et représente la moyenne de 3 échantillons similaires. Chaque signal des graphiques ci-dessus représente la moyenne \pm SEM de 4 expériences séparées. **B. Représentation graphique de la cinétique d'expression du rapport COL2B/COL2A en fonction du temps en normoxie et en hypoxie.**

En normoxie, l'expression des transcrits de COL2A est majoritaire entre J1 et J6 puis diminue lentement jusqu'à J20-J25. COL2B, minoritairement exprimé à entre J1 et J6-J8, devient majoritaire à partir de J14 et maximum à J20-J25. L'hypoxie, accélère le processus de diminution de COL2A et d'augmentation concomitante de COL2B. Le « switch » entre les deux isoformes passe de J8 -J12 en normoxie à J3-J5 en hypoxie. Le rapport COL2B/COL2A (Figure 38B) est maximum dès J6-J8 en hypoxie alors qu'il faut attendre J18-J20 en normoxie.

Les effets de l'addition de M2 [$10^{-6}M$] sont représentés sur la figure 39A et B.

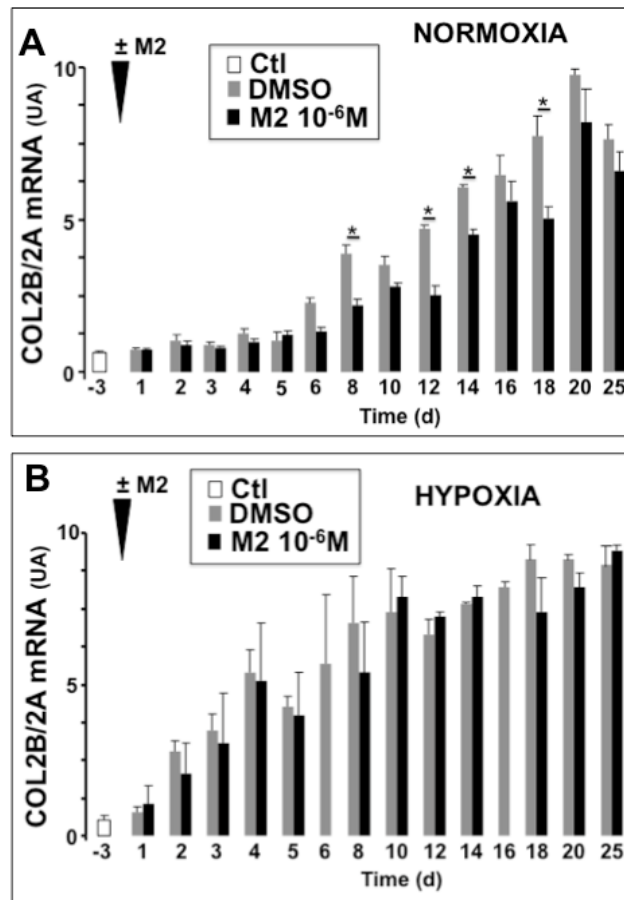


Figure 39. Effets du M2 sur le rapport COL2B/COL2A en normoxie (A) et en hypoxie (B). Les agrégats ont été préparés comme décrits dans le figure précédente, traités ou non par M2 [10⁻⁶M] de J0   J25 et divisés en deux lots, l'un à pO₂= 21% (normoxie) et l'autre à pO₂= 1%. A chaque temps de culture indiqué, les transcrits de COL2A et COL2B ont été quantifiés par RT-PCR comme décrit ci-dessus. Chaque barre représente la moyenne  SEM de 3 expériences séparées, chacune réalisée en 3 exemplaires par temps.

En normoxie, le rapport COL2B/COL2A est significativement diminué en présence de M2 entre J8 et J18. Dans ces conditions expérimentales, M2 n'a plus d'effet significatif à J20 et J25, suggérant un effet transitoire. En revanche aucune différence n'est observée en hypoxie entre les agrégats contrôles et les traités par M2, quel que soit le temps de culture. L'accélération de la vitesse de maturation chondrogénique, accélère le processus de maturation de COL2 et protège les agrégats des effets de M2 sur COL2A.

II. Conclusions et discussion.

Cette partie du travail a permis de montrer que le métabolite M2 et à un moindre degré La génistéine et la vinclozoline peuvent moduler la vitesse de différenciation chondrogénique, dans le modèle C1 DEX-inductible. L'intervention de ces PE porte exclusivement sur l'expression du gène *Col2α1* et plus précisément sur l'isoforme immature COL2A dont l'expression est prolongée par comparaison avec les agrégats non traités, sans affecter COL2B mature.

Le modèle de chondrogenèse DEX-inductible que nous avons utilisé dérive d'un carcinome embryonnaire murin immortalisé par Pk4 (Poliard et al., 1999). L'induction chondrogénique se fait par privation de sérum et en présence de $[10^{-7}\text{M}]$ de dexaméthasone. Schématiquement, cette induction est caractérisée par une augmentation rapide du facteur de transcription SOX9 (J2). L'expression des marqueurs chondrogéniques (*Col2α1* et agrécane) augmente lentement (J6-J25) puis reste en plateau (J32-J36) avec apparition de COL10, marqueur de différenciation terminale, phase précurseur de l'apoptose qui ne survient pas dans ce modèle *in vitro*.

Le gène *Col2α1* est un marqueur chondrogénique majeur. Il est de plus un marqueur du degré de maturation cellulaire des chondrocytes. *Col2α1* subit en effet un épissage alternatif (Ryan and Sandell, 1990) à l'origine de l'expression initiale d'une protéine collagénique immature, COL2A, qui au cours de l'induction chondrogénique diminue avec le temps (*in vitro* de J8 à J25) et est remplacée par la protéine mature COL2B.

L'addition de génistéine, de vinclozoline ou du métabolite M2 de la vinclozoline ne modifie pas le processus d'induction chondrogénique car l'augmentation rapide de Sox9 est toujours observée. V, G ou M2 ne perturbent pas l'effet inducteur de la DEX sur ce processus (comparaison avec l'effet de la Mifépristone, un inhibiteur de l'effet de la DEX). Ces PE ne modifiant pas non plus l'expression d'agrécane, ni de COL10, alors qu'une augmentation faible mais significative de COL2 est observée avec chacun des PE dans un temps restreint correspondant à la maturation de COL2 (J10 à J22) comme indiqué sur la figure 22B. Cette augmentation n'est plus observée à J32. Nous avons émis l'hypothèse que les PE pouvaient intervenir sur la vitesse du processus de différenciation chondrogénique, et plus précisément

sur le processus de maturation de COL2.

Le métabolite M2 étant le plus actif des trois effecteurs étudiés, nous avons centré notre étude sur les effets de ce métabolite. Une étude fine de l'expression respective des transcrits de COL2A et COL2B, en combinant PCR semi-quantitative et quantitative chaque jour pendant 25 jours, a permis de montrer que l'augmentation des transcrits de *Col2a1* par M2 résulte de la persistance de l'expression de COL2A sans altération de l'induction de l'expression de COL2B. La conséquence est un rapport COL2B/2A significativement plus bas qu'en absence de M2 dans les agrégats de chondrocytes différenciés. Ceci est vérifié au niveau protéique par western blot et par immunocytochimie à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'extrémité N- terminale de COL2A (exon 2).

Pour vérifier l'hypothèse d'une intervention de M2 sur la vitesse de maturation de COL2, nous avons comparé les effets de M2 sur le Rapport COL2B / COL2A d'agrégats mis en Hypoxie / Normoxie. Comme attendu, la cinétique de maturation de COL2 observée en hypoxie est significativement accélérée par comparaison avec les conditions de normoxie. On observe une élévation des transcrits de COL2B/COL2A dès le 2ème jour de culture et un maximum observé dès J4-J5, donc plus de 10 jours plus tôt qu'en normoxie. Dans ces conditions, l'addition de M2 n'a plus d'effet significatif ni sur l'expression de COL2A ni sur le rapport COL2B/COL2A. L'hypoxie joue donc un rôle protecteur sur les effets de M2, comme cela a été montré dans d'autres modèles (Thoms et al., 2013).

Ces données *in vitro* sont tout à fait originales et suggèrent une possible altération dans les composants matriciels majeurs des agrégats de cartilage en cas de contact avec des PE pendant la phase de maturation de collagène de type 2. On sait que certaines anomalies génétiques du collagène IX ou du collagène XI portant sur l'épissage alternatif de leurs gènes respectifs, ont pour conséquences de fortes altérations du squelette (Hall, 2002). En présence de M2 l'épissage alternatif de COL2A1 est perturbé et a pour conséquence l'existence de cellules chondrogéniques sécrétant un collagène de type 2 de mauvaise qualité (mélange COL2A + COL2B ou excès de COL2A). Notre hypothèse est que l'excès de COL2A pourrait entraîner *in vivo* des malformations mineures semblables à celles observées dans le syndrome de Stickler, syndrome génétique autosomique dominant, lié à des mutations sur le gène de COL2 (Hall, 2002).

Plusieurs questions se posent sur le plan mécanistique.

Est-ce que l'augmentation de COL2A induite par M2 correspond à une stimulation de la transcription du gène, ou est-ce qu'il s'agit d'une inhibition de la dégradation des ARN

messagers ? Les quelques données préliminaires obtenues (DRB, Cycloheximide) sont plutôt en faveur d'un effet transcriptionnel indirect. Dans cette hypothèse est-ce que M2 stimule un enzyme de dégradation ou un inhibiteur d'inhibiteur ?

Le métabolite M2 fait partie des perturbateurs endocriniens. Il s'agit d'un anti-androgène qui a aussi des effets estrogéniques (Molina-Molina et al., 2006). L'effet de M2 est-il estrogéno-dépendant ? Si oui, passe-t-il par le récepteur ER génomique ou membranaire et par quelle voie de signalisation ?

Pour répondre à ces questions le modèle C1 s'est avéré difficile à maîtriser. D'une expérience à l'autre les vitesses d'induction chondrogénique et de maturation cellulaire sont reproductibles sur de larges tranches de temps telles que la phase précoce avant J4, la période de switch entre J6-J12 et la phase mature <J20. Toutefois, lors d'une même expérience, les agrégats sont relativement hétérogènes à chaque temps donné et la quantification du degré de maturation COL2B/COL2A présente une grande variabilité. Il y a donc nécessité d'utiliser de nombreux échantillons ce qui alourdit considérablement les expériences.

Notre étude a donc été poursuivie sur le plan mécanistique en utilisant un modèle de chondrocytes en culture différenciés (pas ou peu de COL2A) ou dé-différenciés (forte expression de COL2A).

Troisième partie, Résultats *in vitro* (2) : Effets des PE sur un modèle de chondrocytes en culture

I. RESULTATS

1. Expression de COL2A dans le cartilage *in vivo* chez la souris nouveau-né et chez l'adulte.

L'expression de COL2A dans le cartilage de souris *in vivo* après la naissance n'a pas été étudiée. Nous avons analysé par ICC l'expression de COL2A dans le cartilage de souris nouveau-née par comparaison avec des souris adultes vieillissantes. Pour cela nous avons utilisé un anticorps dirigé spécifiquement contre la fraction N-terminale du peptide COL2A.

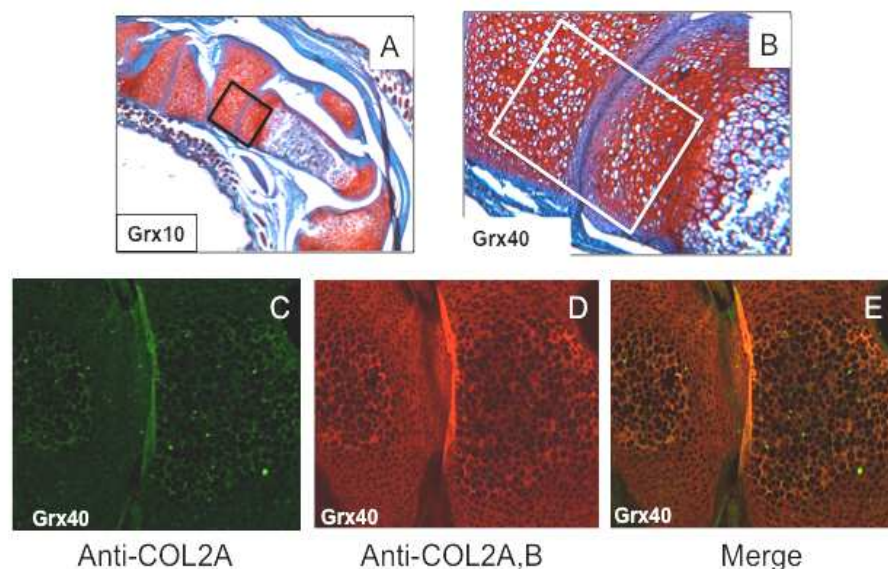


Figure 40. Analyse par ICC de l'expression de COL2A dans le cartilage épiphysaire d'une articulation métatarso-phalangienne de souriceau âgé de 6 jours. Des pattes de souriceau ont été préparées pour analyse histologique et ICC du cartilage comme décrit dans matériel et méthodes. **A.** Image histologique à faible grossissement (Grx10) d'un orteil de souriceau au niveau des articulations métatarso-phalangienne et interphalangiennes après coloration à la safranine. La coloration à la safranine permet de repérer les zones de cartilage de croissance (protéoglycanes en rouge). Le vert Lumière signale la présence de collagène. La zone métatarso-phalangienne est cerclée de blanc et visualisée à fort grossissement en B. **B :** Analyse par ICC. Des coupes adjacentes centrée sur la zone cerclée de blanc ont été analysées par ICC à l'aide de deux anticorps dirigés respectivement contre la fraction N-terminale de l'isoforme COL2A (anti-COL2A = fluorescence verte) et contre la triple hélice de COL2A, B (anti-COL2A, B = fluorescence rouge) avec un comarquage (merge).

Chez le souriceau, les os du pied sont en plein processus d'ossification endochondrale, comme le reste du squelette. Le cartilage est situé aux deux extrémités épiphysaires des métatarses et des phalanges (zone rouge colorée à la safranine) (Figure 40A). Le cartilage articulaire, en surface, est en continuité avec le cartilage de croissance sous jacent et apparaît légèrement moins positif à la safranine (Figure 40B). Sur l'image obtenue par ICC avec l'anticorps anti- COL2A, une fine trame dessine la structure péricellulaire des chondrons, mais le signal est à la limite de la détection. En revanche cette structure est parfaitement positive à l'anticorps dirigé contre la triple hélice du collagène de type 2 (Figure 40D). Le comarquage (Figure 40E) confirme l'expression majoritaire de la triple hélice. Il reste donc très peu de COL2A sous forme protéique au sein du cartilage articulaire après la naissance.

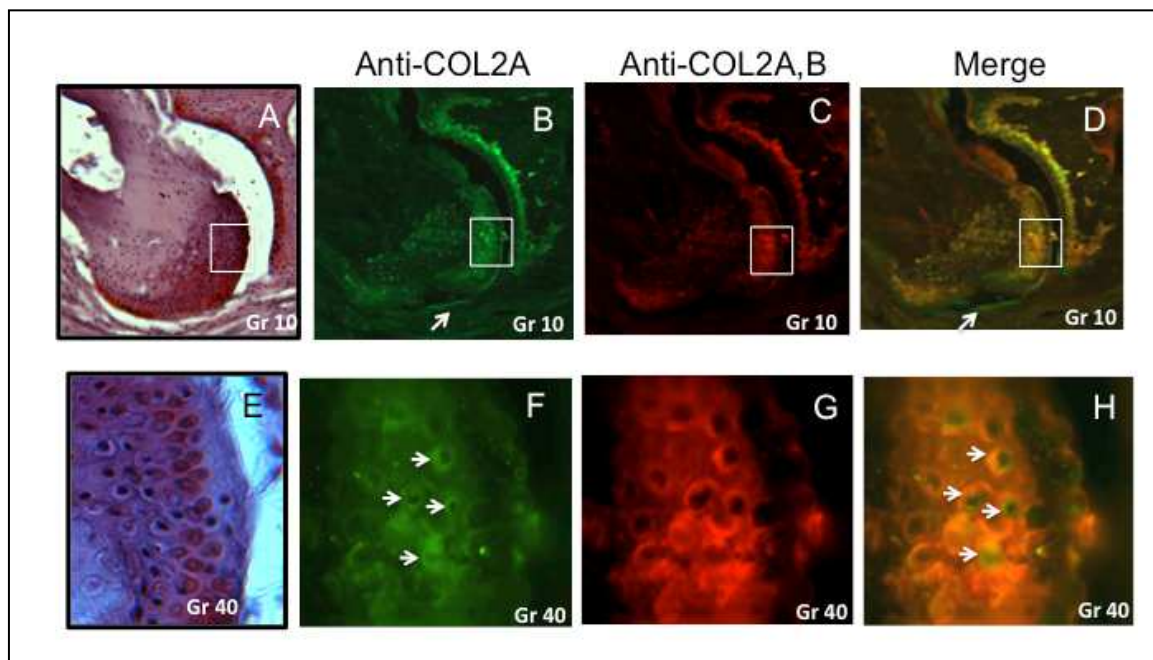


Figure 41. Expression de COL2A dans le cartilage articulaire de souris âgée de plus de 1 an. Des pattes de souris ont été préparées pour analyse histologique et ICC du cartilage comme la figure précédente. **A. Image histologique d'une l'articulation interphalangienne** à faible grossissement (Grx10). La coloration à la safranine O cerne la zone de cartilage articulaire (rouge) au niveau de l'épiphyse de l'os phalagien ainsi qu'à la surface de l'os situé en regard de l'articulation à droite. La zone encadrée est **B,C,D. Analyse par ICC des cartilages articulaires** à l'aide de deux anticorps dirigés respectivement contre la fraction N-terminale de l'isoforme COL2A (**B**) (anti-COL2A = fluorescence verte) et contre la triple hélice de COL2A, B (**C**) (anti-COL2A,B = fluorescence rouge). Le co-marquage est indiqué en (**D**).La flèche en B et D indique une zone sélectivement positive pour COL2A. **E. Image histologique de la zone encadrée en A** à fort grossissement (Gr40). Coloration à la safranine O et au vert Lumière, permettant de visualiser les chondrocytes et leur noyau enchâssés au sein de la matrice extracellulaire. **F,G,H.** Analyse par ICC de la zone d'intérêt comme dans B, C et D. Les flèches en F et H ciblent le signal anti-COL2A.

Les images observées chez la souris adulte vieillissante sont tout autres. Les épiphyses des os longs sont en grande partie ossifiées, même si l'on sait que la croissance des os persiste toute la vie chez les souris. La figure 41A délimite une zone de cartilage (safranine positive) située en périphérie de la tête phalangienne et de l'articulation en regard. Les images d'ICC montrent que l'isoforme COL2A est exprimé sur toute la surface articulaire. Le signal anti-COL2A est clairement observé dans la zone de cartilage, alors qu'il est absent au niveau de l'os. Le signal obtenu avec l'anticorps anti-triple hélice est lui aussi bien visible et le co-marquage est presque uniforme. Toutefois certaines zones semblent positives à l'anticorps anti-COL2A et négatives à l'anti-COL2A,B, comme le montre la flèche dans la zone périphérique basse de la tête phalangienne (Figure 41B et 41D) et la zone encadrée. Pour analyser plus finement si certaines zones du cartilage vieillissant sont sélectivement positives pour l'anticorps anti-COL2A, nous avons étudié la zone encadrée à plus fort grossissement.

La figure 41F montre que le signal anti-COL2A dessine nettement le pourtour des chondrocytes (flèches). L'anticorps anti-triple hélice du COL2 semble recouvrir la même surface (Figure 41G). Toutefois sur la figure 41H en co-marquage, on distingue nettement la persistance d'un signal vert à l'intérieur du signal orange. Ce signal protéique dessine le contour des chondrocytes sans qu'on puisse préciser s'il est intra- ou peri-cellulaire.

En conclusion, l'expression de COL2A est significative dans le cartilage de souris vieillissante alors que dans le cartilage épiphysaire de souriceaux cette expression est à la limite de détection.

2. Expression de COL2A dans les chondrocytes en culture extraits de cartilage de souriceaux.

Le modèle de culture de chondrocytes utilisé pour étudier les effets des PE utilise les chondrocytes extraits de cartilage épiphysaire de souriceaux en culture primaire (chondrocytes différenciés) ou après passages successifs, avec ou sans bFGF (chondrocytes dédifférenciés).

L'expression des isoformes COL2A et COL2B a été suivie au niveau transcriptionnel par PCR semi quantitative. La figure 42 confirme l'absence de détection de l'isoforme COL2A dans le cartilage épiphysaire de souriceaux *in vivo* alors que les transcrits de l'isoforme

COL2B sont largement exprimés. En revanche, dans les chondrocytes en culture, l'expression des transcrits de COL2A est observée quel que soit le stade de différenciation. Ce signal est d'intensité plus faible que le signal COL2B dans les chondrocytes P0 et P3 sans effecteur.

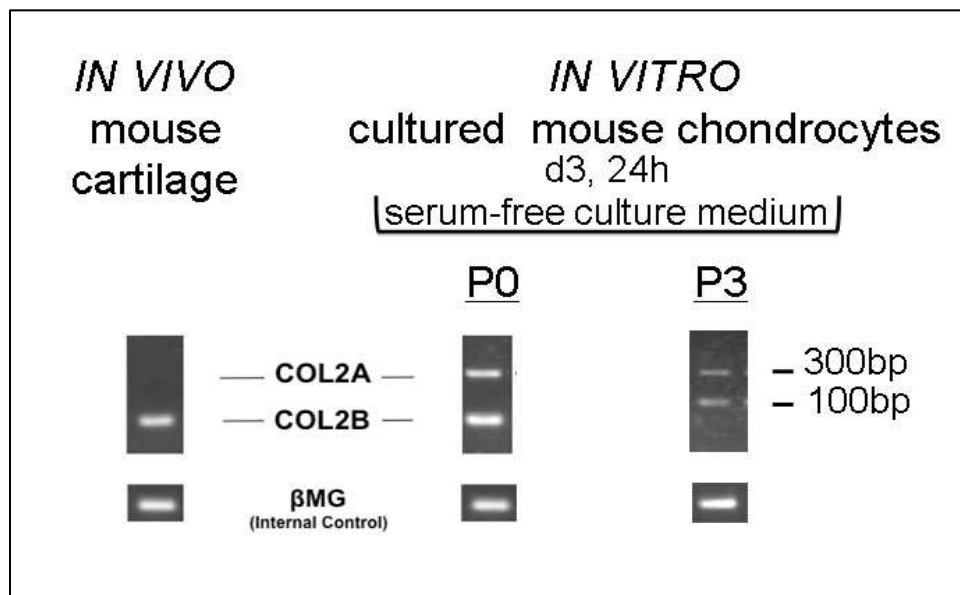


Figure 42. Comparaison de l'expression des transcrits de COL2A et COL2B dans le cartilage de souris *in vivo* et dans les chondrocytes extraits du cartilage et mis en culture. Les ARN totaux de cartilage épiphysaire de souriceaux et de chondrocytes extraits de cartilage et mis en culture primaire et analysés pour l'expression de COL2A et de COL2B par RT-PCR semi-quantitative comme décrit dans méthodes. Dans chaque cas l'expression du gène d'intérêt est rapportée à l'expression de beta2 microglobuline (β MG) pris comme référence interne. Les signaux observés dans le cartilage *in vivo* sont comparés à ceux observés à partir de chondrocytes en culture primaire (P0) et en culture secondaire (P3). L'analyse été réalisée au 3^{ème} jour de culture, après 24h d'incubation sans sérum.

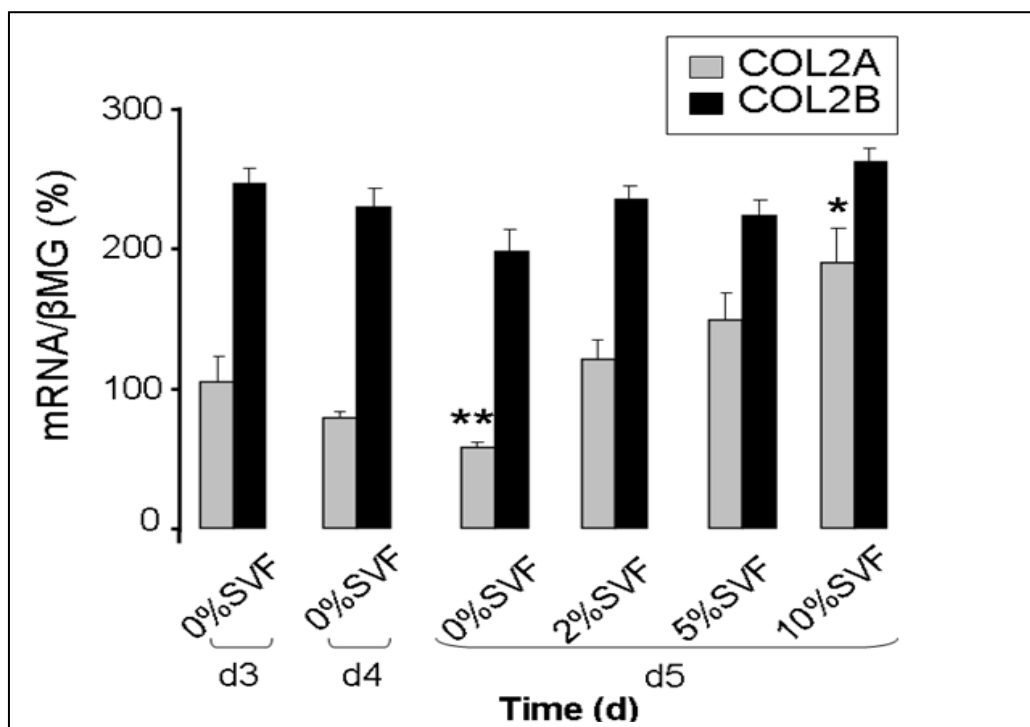


Figure 43 Effet du serum sur l'expression de COL2A et COL2B dans les chondrocytes en culture primaire en P0. Les ARN totaux sont extraits de chondrocytes en culture P0 toutes les 24h de J3 à J5, en absence ou présence de sérum comme indiqué sur la figure. L'expression des ARN messagers de COL2A et de COL2B est analysée comme dans la figure précédente. Chaque barre est la moyenne \pm SEM de trois échantillons rapportées au taux de transcrits de COL2A mesuré à J3, arbitrairement évalué à 100. * : $p < 0,05$ / J3 ; ** : $p < 0,01$ / J3. $n=3$.

Le sérum est l'un des éléments majeurs à l'origine du processus de dédifférenciation cellulaire des chondrocytes en culture. La figure 43 illustre ses effets sur l'expression de COL2A.

La privation de sérum induit une diminution progressive des ARNm de COL2A en fonction du temps avec un taux diminué de 50% à 24h et d'environ 75%-80% à 48h. En revanche, le taux d'ARNm de COL2B reste constant sur 48h en accord avec la longue demi-vie de ce transcrit. Il est intéressant de constater que l'addition de sérum induit une augmentation des transcrits de COL2A, en fonction de la concentration de sérum, alors que les transcrits de COL2B ne sont pas modifiés.

Ces données confirment que plus le degré de dédifférenciation est grand plus l'expression de COL2A est importante et montrent que cette expression est modulée par l'addition de sérum. Quels sont les effets des PE ?

3. L'expression de COL2A des chondrocytes en P0 n'est pas modifiée par les Perturbateurs Endocriniens (PE).

L'addition des PE a été faite à J3 en absence de sérum. La diminution progressive du taux d'ARNm de COL2A, observée en absence de sérum et d'effecteurs, devient significative à 24h (50% / temps 0) et n'est pas modifiée par l'addition de M2 seul ou en combinaison avec G à forte dose [10^{-6} M]. L'addition des PE ne modifie pas non plus l'expression de COL2B qui reste stable sur 24h (Figure 44A).

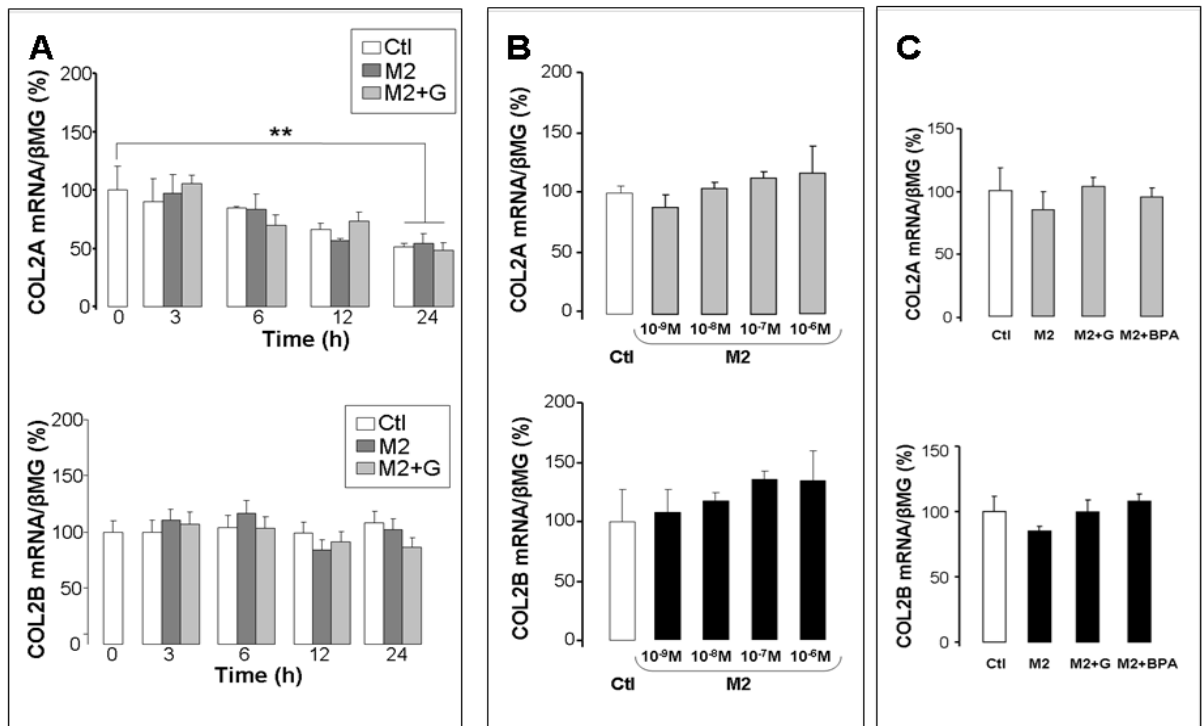


Figure 44. Effets de M2 seul ou combiné à G et/ou BPA sur l'expression de COL2A et de COL2B par les chondrocytes en culture primaire P0. Les chondrocytes en culture primaire P0 sont privés de sérum à J3 et incubés ou non avec les PE à différentes doses et pendant des temps différents. L'expression des transcrits de COL2A (haut) et COL2B (bas) est analysée par PCR semi-quantitative. **A.** Effets de M2 [10^{-6} M] seul ou combiné à génistéine (G) [10^{-6} M] sur la cinétique d'expression des transcrits en fonction du temps de 3h à 24h. **B.** Effet-dose de M2 à 24h. **C.** Effet de M2 en combinaison avec génistéine (M2+G) ou bisphénol A (M2+BPA) à 24h après 15 jours de traitement continu. Chaque barre correspond à la moyenne \pm SEM de 3 échantillons. Les figures proviennent de 3 expériences séparées. **= $p < 0,01$ / temps 0.

On sait que les PE peuvent avoir des effets opposés suivant la dose utilisée. Nous avons réalisé une étude en fonction de la dose de chaque PE. Aucun effet n'a été observé quel que soit l'effecteur. Seules les données observées avec M2 sont présentées figure 44B.

Enfin, nous nous sommes demandé si le temps d'exposition aux PE pouvait intervenir. Les chondrocytes ont été traités par les PE à $[10^{-6}\text{M}]$ pendant 15 jours. Aucun effet sur l'expression des transcrits de COL2A ou de COL2B n'est observé (figure 44C) ni avec M2 seul ni en combinaison avec la génistéine (M2+G) ou le bisphénol A (M2+BPA).

4. L'expression de COL2A des chondrocytes en P0 est modulée par le bFGF.

Il a été montré dans d'autres modèles de chondrocytes en culture que l'expression de COL2A est modulée par des facteurs de croissance comme le TGF β et la BMP2 (Valcourt et al., 2003; Zhu et al., 1999). Le bFGF est considéré comme un facteur majeur de dédifférenciation des chondrocytes *in vitro*. Nous avons étudié ses effets, seul ou associé aux PE, sur l'expression de COL2A.

La Figure 45A montre que l'addition de bFGF aux chondrocytes augmente significativement le taux d'ARNm d'un facteur allant de 1,5 à 2 par rapport à T0, et d'un facteur 3 par rapport à l'expression de COL2A en conditions basales. L'expression de COL2B est peu ou pas modifiée. Ces données sont proches de celles observées en présence de sérum.

Lorsque les PE sont ajoutés au bFGF, aucun effet supplémentaire n'est observé que ce soit avec M2 seul, ou avec génistéine (M2+G) (Figure 45) ou avec le bisphénol A (M2+BPA) (non montré).

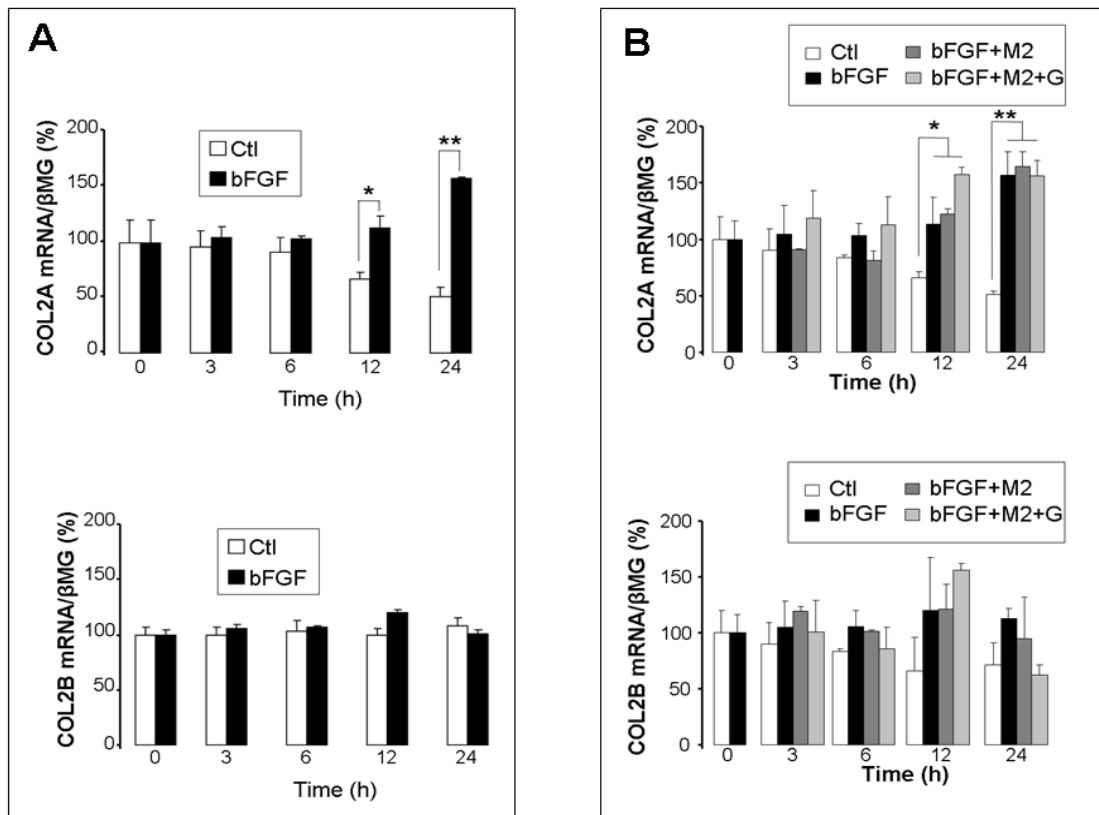


Figure 45. Effet du bFGF seul ou en combinaison avec des PE, sur l'expression de COL2A et COL2B par les chondrocytes P0. Les chondrocytes en culture primaire P0 sont privés de sérum à J3 et incubés ou non avec bFGF seul à 10 ng/ml ou en combinaison avec les PE à 10-6M, pendant variant de 3h à 24h. L'expression des transcrits de COL2A (haut) et COL2B (bas) est analysée par PCR semi-quantitative. Chaque barre correspond à la moyenne \pm SEM de 3 échantillons. **A. effets du bFGF seul.** *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; bFGF/ son contrôle, $n=8$. **B Effets des combinaisons bFGF +M2 et bFGF +M2 +Génistéine.** $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, traitement/ contrôle, $n=8$.

5. L'augmentation de COL2A par le bFGF est en partie transcriptionnelle, indirecte et implique la protéine d'épissage TIA-1.

Les mécanismes de régulation de l'expression des transcrits de COL2A par les facteurs de croissance n'ont pas été établis et les facteurs qui régulent l'épissage du gène *Col2a1* ne sont pas connus.

Nous avons voulu savoir si l'augmentation des transcrits de COL2A par le bFGF était ou non d'origine transcriptionnelle et /ou dépendant d'une néosynthèse protéique.

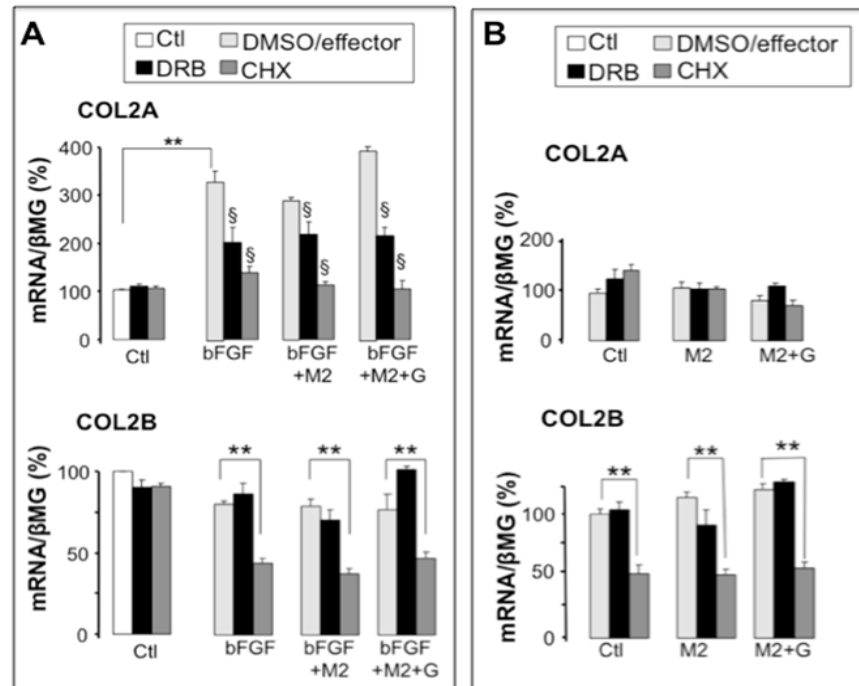


Figure 46. Effets d'un inhibiteur de la transcription (DRB) et d'un inhibiteur de la traduction (CHX) sur l'expression de COL2A et COL2B sur les chondrocytes P0 traités ou non par le bFGF ± PE. Les chondrocytes en culture primaire P0 sont privés de sérum à J3 et incubés ou non pendant 24h avec le DRB ou la cycloheximide (CHX) en présence ou absence de bFGF ou de PE seuls ou en combinaison. L'expression des transcrits de COL2A (haut) et COL2B (bas) est analysée par PCR semi-quantitative comme décrit précédemment. Chaque barre correspond à la moyenne ± SEM de 3 échantillons. **A. Chondrocytes incubés avec bFGF seul, bFGF avec M2 ou bFGF avec M2+G. B. Chondrocytes en conditions basales ou avec PE.** Statistiques COL2A : **p< 0,01 : bFGF/ Ctl ; § p<0,01 : DRB ou CHX / effecteurs seuls. COL2B: **p< 0,01 CHX/ effecteurs seuls. n=6

La figure 46A (panneau du haut) montre que l'augmentation des transcrits COL2A sous bFGF est partiellement diminuée (-20%, -40%) sous DRB et effondrée en présence de CHX (retour aux valeurs contrôles). L'addition des PE ne modifie pas l'effet du bFGF seul. Ces données suggèrent que COL2A est au moins en partie régulé par le bFGF de façon transcriptionnelle et qu'une protéine intermédiaire est impliquée.

Par comparaison, dans les conditions de base avec ou sans PE l'addition de DRB ou de CHX ne modifie pas le taux de transcrits de COL2A (Figure 46B, panneau du haut).

Comme attendu, l'expression de COL2B (Figure 46A et B, panneaux du bas) est essentiellement sous contrôle d'une néosynthèse protéique que ce soit en absence ou en présence de bFGF, en relation avec le rôle majeur du facteur de transcription SOX9 sur la

transcription du gène *Col2a1*. Dans nos conditions expérimentales, le bFGF ne stimule pas les facteurs de transcription Sox9, Sox5 et Sox6, médiateurs majeur de l'expression du collagène 2 (données non montrées).

Les expériences de cinétique de l'expression de COL2A sous DRB, montrent que la demi-vie des ARNm de COL2A est supérieure à 72h et n'est pas modifiée par le bFGF. Ceci suggère que l'augmentation des ARNm de COL2A induite par le bFGF ne résulte pas majoritairement d'une inhibition de la dégradation. Les demi-vies de COL2A en absence et en présence de bFGF sont représentées sur la figure 47 ci-dessous.

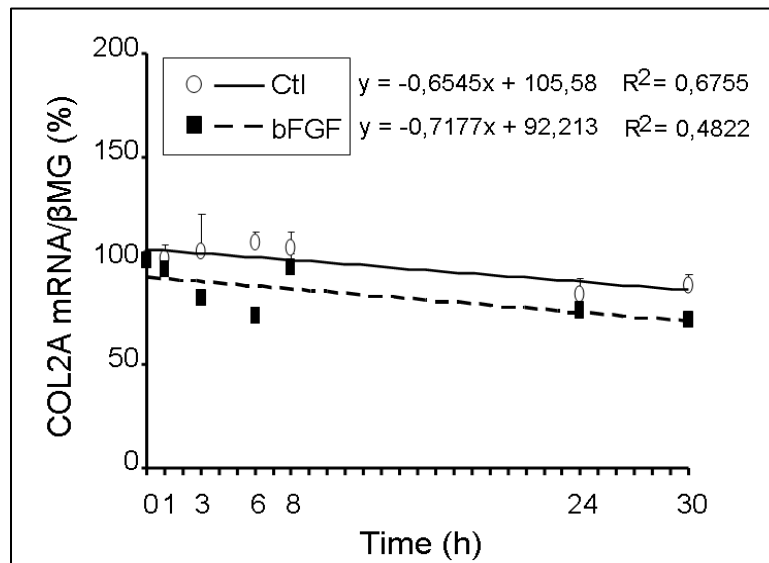


Figure 47. Représentation des demi-vies de COL2A en conditions basales et en présence de bFGF dans les chondrocytes en P0. Les chondrocytes sont privés de sérum à J3, puis incubés pendant 30h avec du DRB, en présence ou non de bFGF. L'expression des transcrits de COL2A est analysée par PCR semi-quantitative comme décrit précédemment. Chaque point représente la moyenne \pm SEM de trois échantillons. n=3.

Nous avons alors émis l'hypothèse que le bFGF pourrait agir sur une ou plusieurs protéines d'épissage permettant à l'exon 2 du gène *Col2a1* d'être exprimé. Peu d'éléments sont connus sur la régulation de l'épissage de COL2A. Nous avons choisi d'étudier la protéine TIA-1 qui est impliquée dans l'épissage alternatif de nombreux gènes, dont *Col2a1*. TIA-1 pourrait promouvoir l'expression de l'isoforme COL2A ainsi que sa stabilisation.

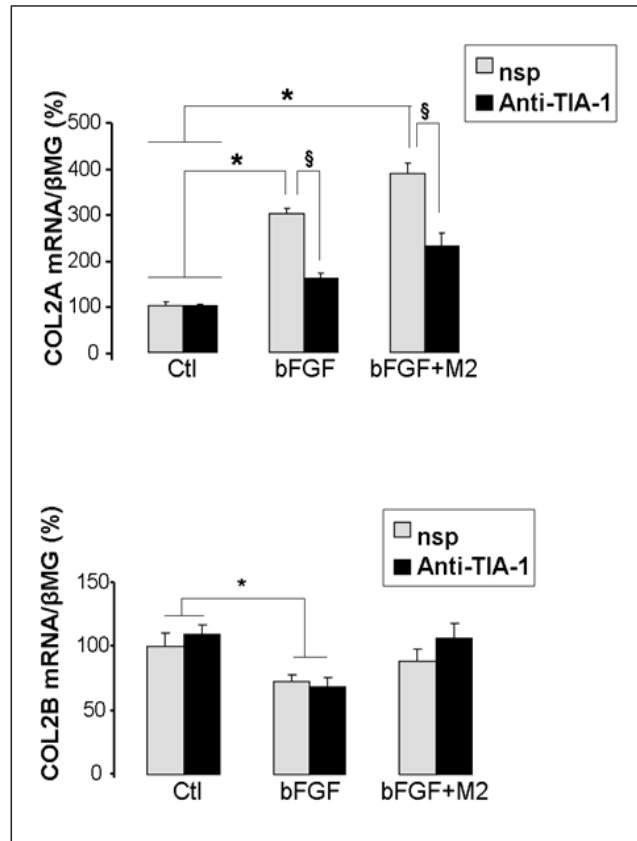


Figure 48. Effet de l'inhibition de l'expression de TIA-1 par un siRNA sur la stimulation de COL2A par le bFGF. Les chondrocytes sont mis en culture primaire. A J3 les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre TIA-1, ou non spécifique (nsp). Les cellules sont ensuite incubées avec ou sans bFGF pour 24h. Les ARNm ont été étudiés comme précédemment. Chaque barre est la moyenne \pm SEM de trois échantillons similairement traités. * : $p < 0,05$ bFGF/Ctl ; § : $p < 0,05$ anti-TIA-1/nsp . Cette expérience est représentative de 3 expériences séparées. $n=3$.

Nous avons utilisé une série de trois siRNA dirigés contre TIA-1, dont l'efficacité s'est montrée respectivement de 35, 80 et 25% sur l'expression des transcrits de TIA-1. La figure 48 montre qu'en présence du Si-RNA inhibant 80% de l'expression de TIA-1, l'augmentation de COL2A induite par le bFGF seul ou bFGF + M2 est diminuée respectivement de 50% et 40%.

Aucune modification de l'expression de COL2B n'est observée. TIA-1 pourrait donc être un médiateur de l'action spécifique de bFGF sur COL2A.

6. Les PE sont actifs sur le COL2A exprimé par les chondrocytes différenciés après passage en P3 et leurs effets sont de type estrogénique.

Nous avons étudié les effets des PE sur des chondrocytes différenciés par passages successifs en P3.

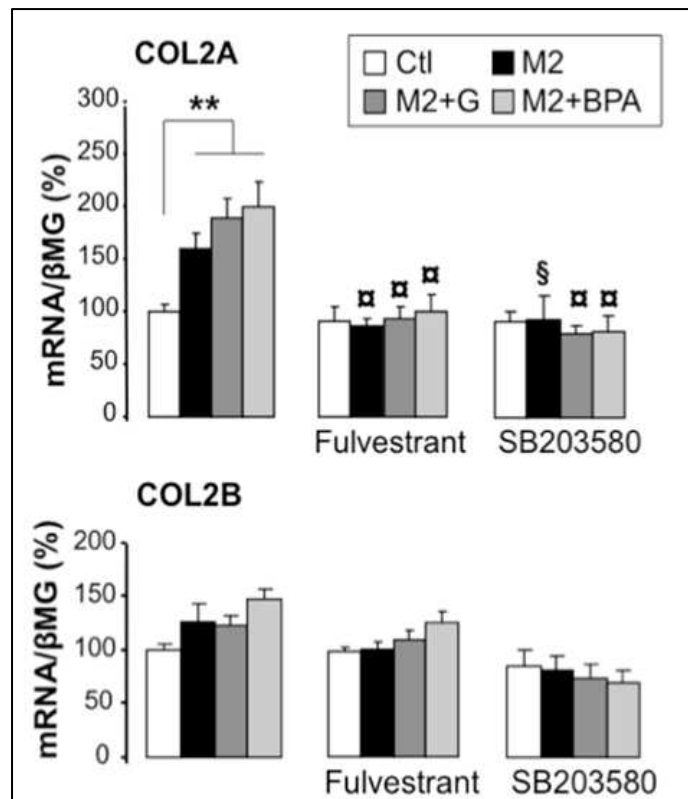


Figure 49. Effet de M2 seul ou combiné à G ou BPA sur l'expression de COL2A et COL2B par les chondrocytes P3. Les chondrocytes sont mis en culture primaire puis repiqués deux fois. Les chondrocytes en P3 sont incubés ou non avec M2 seul ou combiné avec G ou BPA à $[10^{-6}M]$ pendant 24h. **: $p < 0.01$ PE/Ctl ; § : $p < 0.05$ M2+SB/M2 ; α : $p < 0.01$ PE ± SB ou F/PE respectif. n=3.

Dans ces conditions, l'addition des PE augmente (de 1,5 à 2 fois) significativement les taux de transcrits de COL2A, par comparaison avec les cellules non traitées. Aucun effet n'est observé sur les ARNm de COL2B (Figure 49).

Nous avons voulu vérifier que cette activité est médiée par les récepteurs aux estrogènes (RE). Pour cela nous avons utilisé un antagoniste pur du récepteur aux estrogènes, le Fulvestrant, ou ICI 182 780, à la même dose que les PE. Nous observons tout d'abord sur la figure 49C que l'addition de Fulvestrant (F) n'a pas d'effet sur le témoin. En revanche, l'addition de F aux différentes incubations avec les PE (M2 seul, M2+G, M2+BPA) supprime

cet effet, qui reste au niveau des contrôles sans PE. Le fulvestrant n'a pas d'effet significatif sur l'expression de COL2B, avec ou sans les PE (figure 49).

Parmi les PE étudiés, la génistéine est connue pour activer des voies de signalisation non génomiques, dont la voie des MAPK par l'intermédiaire des récepteurs aux estrogènes membranaires. Comme les effets stimulants des PE passent par les RE, nous avons voulu savoir si la combinaison M2+G pouvait interférer avec la voie des MAPK, ainsi que l'association M2+BPA. Pour cela, nous avons inhibé pendant 24h la voie impliquant la protéine p38-MAPK grâce au composé SB203580. La figure 49 montre que le niveau basal d'expression de COL2A n'est pas modifié par SB203580, alors que les effets stimulants des PE sur COL2A sont supprimés. Ces données montrent que l'effet stimulant des PE sur l'expression du COL2A est, au moins en partie, médié par la voie p38-MAPK.

Par ailleurs, les PE n'ont pas d'effet significatif sur l'expression du COL2B confirmant une spécificité d'action des PE sur COL2A, indépendamment de COL2B.

II. DISCUSSION ET CONCLUSION

Certains Perturbateurs Endocriniens (PE) entraînent des malformations squelettiques, mais leur mécanisme d'action reste mal connu (voir introduction). Lors d'un premier travail réalisé *in vivo* chez le rat Wistar, nous avons montré que l'exposition à la vinclozoline, à la génistéine ou au BPA pendant la gestation, entraîne chez le jeune animal, essentiellement femelle, des modifications de la taille des vertèbres (TA Auxietre et al., soumis à Toxicology, en révision). Les modifications observées rappellent les dysplasies épiphysaires du type du syndrome de Stickler (revue dans (Hall, 2002)). Les dysplasies épiphysaires sont liées à des mutations de divers gènes appartenant aux complexes périfibrillaires, tels que COMP, matriline-3 et collagène de type IX (Chen et al., 2008; Suleman et al., 2012; Zaucke and Grässel, 2009). Les dysplasies liées aux mutations du procollagène de type II, sont souvent groupées sous le nom de Syndrome de Stickler) (Ballo et al., 1998; Brown et al., 1992; Nikopoulos et al., 2011; Spranger et al., 1994). En outre, des maladies diverses, ne portant pas seulement sur le cartilage, sont liées à des mutations dans les séquences d'épissage du pré-messager du procollagène de type II, comme la rétinopathie de Wagner, le syndrome d'Ehler-Danlos et la spondylodysplasie congénitale (Snead and Richards, 2002; Tiller et al., 1995; Weil et al., 1988). Nous avons fait l'hypothèse que les PE pourraient agir sur l'expression des collagènes ou l'épissage de leurs ARNm au cours du développement du cartilage de croissance lors du processus d'ossification endochondrale, reproduisant des symptômes comparables à ces maladies.

La première partie de ce travail, l'étude *in-vivo* a révélé un certain nombre de résultats qui supportent notre hypothèse (Sub-NOAEL amounts of vinclozolin and xenoestrogens target rat chondrogenesis *in vivo*. Auxietre, TA et al., submitted to Toxicology, currently in revision. Nov. 2013).

Les PE ont démontré un effet sur le développement du squelette à dose inférieure à leur NOAEL déterminé sur animaux adultes. Les effets observés se situent au niveau des vertèbres, évoquant les dysplasies épiphysaires décrites plus haut. Ces effets portent plus précisément sur la plaque de croissance du cartilage. Les PE modifient en effet la dynamique de maturation cellulaire du cartilage rappelant les effets des estrogènes lors de la soudure du

cartilage post pubertaire. Ces effets pourraient avoir des conséquences sur la qualité fonctionnelle des os chez l'animal âgé.

Nous avons enfin observé que la génistéine n'avait que peu d'effets, seule ou en association, et tendait même à effacer les effets de la vinclozoline (figures 26A et 29). Le BPA a montré un effet propre, de nature oestrogénique sur la maturation des chondrocytes (figure 28). Aucune expérience n'a suggéré un effet de type cocktail. Nous avons donc focalisé notre intérêt sur le composé le plus actif : la vinclozoline, et son métabolite M2 pour les expériences *in-vitro*.

Dans notre cas, le choix de quatre animaux par situation peut être critiqué, mais il s'est avéré nécessaire vu la nature « prospective » et pionnière de notre travail qui explorait simultanément un nombre élevé de questions distinctes. Il est évident que ce chiffre sera insuffisant pour de futures études plus focalisées ciblant un des effets que nous avons identifiés, comme par exemple l'effet sur la prolifération des chondrocytes. Ces études pourront, avec plus d'animaux et moins de questions, établir un NOAEL et une courbe dose-réponse. Cela pourra être pratiqué par fenêtre d'exposition spécifique. En effet, nos animaux ont été traités pendant toute la gestation et la lactation. Quels seraient les effets de la vinclozoline et des xénoestrogènes lors d'une exposition purement lactationnelle, purement gestationnelle ou ciblant un mois spécifique de la gestation ?

Dans la suite de l'étude, la partie *in-vitro* a tiré parti de deux modèles distincts.

Le modèle cellulaire d'induction chondrogénique, permettant de suivre la dynamique d'expression des marqueurs de différenciation, a montré que l'addition de PE aux cellules modifie l'expression de COL2A immature sans affecter l'expression de COL2B, ni les autres marqueurs phénotypiques tels que SOX9 ou l'agrécan. La fonction de l'isoforme immature COL2A n'est pas connue, mais des études récentes ont avancé l'hypothèse que COL2A pourrait être un marqueur de dédifférenciation chondrocytaire (Gouttenoire et al., 2010).

Le but de ce travail a donc été d'étudier la régulation de l'expression de COL2A par les PE dans un modèle de chondrocytes différenciés par comparaison avec des chondrocytes dédifférenciés. A ce jour aucune étude ne porte sur les effets des PE sur le collagène de type 2. L'expression de COL2A dans le cartilage a été essentiellement étudiée chez l'embryon au cours du développement du squelette. COL2A est exprimé dans les cellules pré-

chondrogéniques et disparaît au profit de COL2B dans le cartilage différencié (Lui et al., 1995; Sandell, 1994). En revanche peu d'études portent sur le cartilage post-natal et adulte (Lewis et al., 2012).

Dans le cartilage épiphysaire des os longs de souris à la naissance, nous montrons que l'expression de COL2A est à peine détectable, que ce soit au niveau des ARN messagers (PCR semi quantitative) ou au niveau du signal protéique (ICC). Ces données sont un peu différentes de celles de l'étude de l'équipe de Lewis (Lewis et al., 2012) qui indique que le COL2A est détecté au 7^e jour après la naissance au niveau de l'épiphyse, majoritairement en périphérie du cartilage articulaire. A cet âge, le cartilage épiphysaire est un cartilage de croissance dans lequel il est difficile de séparer fonctionnellement le cartilage articulaire. Il est possible que dans le cartilage épiphysaire, l'expression de COL2A se limite à certaines zones comme par exemple la zone de surface où se trouvent encore des cellules souches préchondrogéniques, ou à la zone profonde de différenciation terminale des chondrocytes. Les données de la littérature concernant l'expression de COL2A au niveau du processus de différenciation terminale ne sont pas claires. Pour certains il y aurait réexpression de COL2A dans les zones profondes du cartilage, pour d'autres non (Salminen et al., 2001).

Chez la souris adulte vieillissante, nous montrons que l'expression de COL2A est présente dans tout le cartilage articulaire. Ces données sont en accord avec les quelques données de la littérature qui montrent que COL2A est significativement exprimé dans le cartilage articulaire arthrosique tant chez l'homme (Aigner et al., 1999) que chez l'animal dans un modèle de souris transgénique arthrosique (Salminen et al., 2001).

Dans notre étude, les images à fort grossissement montrent une localisation de COL2A (vert) enclavée dans la matrice de COL2 (rouge-orange), et dessinant le pourtour des cellules. Le signal anti- COL2A est spécifique de l'extrémité N terminale de la protéine. Ce signal peut donc correspondre à la protéine COL2A entière ou à son pro-peptide après coupure enzymatique dans la région péri-membranaire. Vu sa localisation, il nous est permis de penser qu'il peut être péricellulaire ou membranaire. Ces données sont proches de celles de Lewis, pour qui le signal COL2A est intracellulaire. Ces auteurs émettent l'hypothèse que la présence de COL2A pourrait être due à une recapture du propeptide par la cellule. Pour d'autres, la protéine COL2A néosynthétisée pourrait être piégée dans des fibrilles de collagènes formé par le COL2B en péricellulaire ainsi qu'en interterritorial, dans la matrice, comme cela a été observé dans les bourgeons de membres chez l'embryon de poulet de 7 jours (Nah et al.,

2001). Nos résultats ne permettent pas de trancher sur la localisation intra- ou péricellulaire du COL2A. Cependant en raison des processus de biosynthèse et de processing des collagènes lors de leur sécrétion, ce propeptide pourrait effectivement rester en périphérie de la cellule où son rôle reste à définir : rétention de facteurs autocrines ou paracrines, de récepteurs ou de ligands peptidiques (Gouttenoire et al., 2010; Valcourt et al., 2003; Zhu et al., 1999). De plus, sous l'effet de divers stimuli (cytokines, facteurs de croissance, hormones ...), COL2A pourrait être soit néosynthétisé, comme cela a été suggéré dans le cartilage pathologique chez l'homme (Aigner et al., 1999), soit demeuré rémanent. Ces hypothèses restent à étudier.

Les facteurs de régulation de l'expression de COL2A sont peu connus. Gouttenoire, Valcourt (Gouttenoire et al., 2010; Valcourt et al., 2003) et Zhu (Zhu et al., 1999) ont montré que COL2A est régulé par certains facteurs de différenciation chondrocytaires (BMP2, TGF β), dans des chondrocytes embryonnaires *in vitro* (Gouttenoire et al., 2010). Ces auteurs ont également montré que l'expression de COL2A est proportionnelle au degré de dédifférenciation de chondrocytes de cartilage costal d'embryons de souris en culture (Gouttenoire et al., 2010). Néanmoins le mode d'action de ces facteurs n'est pas connu.

Les chondrocytes sont connus pour leur instabilité phénotypique *in vitro*. De nombreux facteurs sont impliqués dans le processus de dédifférenciation chondrocytaire, parmi lesquels, la densité cellulaire de départ, l'âge des tissus donneurs, la pO₂ environnementale et les facteurs sériques tels que les facteurs de croissance cellulaire.

Dans notre modèle de chondrocytes de souriceaux en culture primaire, l'expression de COL2A est significative dès les premiers jours de culture (30% de COL2 total, COL2A+COL2B) alors qu'aucune expression de COL2A n'est détectée dans le cartilage d'origine *in vivo*. La suppression du sérum s'accompagne d'une diminution progressive des transcrits de COL2A avec le temps. Ils ne représentent plus que 20% à 25% de COL2 total à 48h. Le taux de COL2B ne varie pas significativement dans cette période de temps en rapport avec la très longue demi-vie de ce transcrit. L'addition du métabolite M2 de la vinclozoline, de la génistéine ou de BPA se fait en absence de sérum. Aucun effet sur COL2A ou COL2B n'est observé, quelle que soit la dose utilisée ([10⁻⁹M]-[10⁻⁶M]) et la durée de traitement (24h ou 15 jours).

Par comparaison, nous montrons pour la première fois, que l'addition de sérum ou de bFGF, facteur de dédifférenciation des chondrocytes *in vitro*, s'accompagnent d'une

augmentation significative (x3) de COL2A. Nous avons choisi d'approfondir le mécanisme d'action du bFGF sur l'expression de COL2A. Nous montrons que l'effet stimulant de bFGF sur les transcrits de COL2A est en partie transcriptionnel et dépend de la néosynthèse d'une protéine dont la nature est à déterminer.

De nombreux facteurs de transcription peuvent influencer sur l'expression du gène *Col2a1*, dont le maître-facteur de transcription Sox9, ainsi que ses cofacteurs L-Sox5 et Sox6 (Lefebvre et al., 1998), mais aussi d'autres facteurs comme sp1 et sp3 (Chadjichristos et al., 2003). Ces facteurs Sox sont indispensables à la transcription de COL2A et COL2B.

Le bFGF n'a pas d'activité sur l'expression de Sox9, indiquant que l'effet de bFGF sur COL2A n'est pas médié par Sox9. Nos résultats suggèrent que le bFGF pourrait stimuler l'expression d'une protéine impliquée dans la stabilisation et/ou la dégradation de COL2A. La protéine, TIA-1, qui est une protéine se liant aux RNA (RNA binding protein), a été pressentie comme candidate à la régulation de COL2A, tant dans l'inclusion de l'exon 2 lors de l'épissage alternatif, que dans la fixation à l'ARNm et sa possible stabilisation (McAlinden et al., 2007). L'utilisation de siRNA dirigés contre TIA-1 supprime l'augmentation de COL2A induite par le bFGF, apportant donc un argument en faveur de cette hypothèse. Toutefois, d'autres protéines impliquées dans l'épissage, telles que Hur (Barron and Lou, 2012) pourraient aussi être impliquées dans ce processus. Ces données originales permettent pour la première fois de montrer une modulation spécifique de COL2A par rapport à COL2B.

En ce qui concerne les PE, nous avons vu qu'ils n'ont pas d'effet sur les chondrocytes différenciés. En combinaison avec le bFGF, ils ne modifient en rien les effets de ce facteur sur COL2A.

En revanche, lorsque les PE sont administrés à des chondrocytes dédifférenciés par plusieurs passages (chondrocytes en P3), un effet stimulant, similaire à celui du bFGF et du sérum est observé. Les PE utilisés dans ce travail ont tous une affinité plus ou moins importante pour les récepteurs estrogéniques. Leurs effets peuvent donc être médié par les récepteurs nucléaires soit par les récepteurs membranaires. Nous montrons que l'effet stimulant des PE sur COL2A est significativement diminué en présence de Fulvestrant (antagoniste pur aux récepteurs aux estrogènes (ERs) ce qui confirme l'activité estrogénique des PE. Rappelons que la plaque de croissance du cartilage contient des récepteurs aux estrogènes (ER) (Dayani et al., 1988; Morishima et al., 1995; Nilsson et al., 2003; Smith et al., 1994).

L'effet des PE est totalement supprimé par un inhibiteur de la voie p38-MAPK, mais pas par un inhibiteur de la voie ERK-1/2. Ces données sont en faveur d'un effet estrogénique des PE sur COL2A par le récepteur membranaire médié par la voie p38-MAPK.

La génistéine est aussi connue pour emprunter des voies non génomiques qui impliquent des ERs membranaires pouvant être couplés à la cavéoline et aux voies MAPK (Jeng et al., 2009; Liao et al., 2013; Watson et al., 2012), c'est également un inhibiteur de tyrosine kinases (Dixon, 2004). Nous pouvons donc suggérer, que les PE utilisés pourraient stimuler l'expression du COL2A par l'intermédiaire de récepteurs membranaires engendrant des voies de signalisation dont la voie MAPK.

En conclusion, nous pouvons dire que les PE ne sont pas actifs sur les chondrocytes différenciés. En revanche, ils peuvent modifier l'expression du collagène2 sur les chondrocytes en voie de dédifférenciation. Ces derniers pourraient s'apparenter à des chondrocytes fragilisés comme ils le sont dans le vieillissement ou dans des conditions pathologiques.

La stimulation du COL2A par ces PE pourrait causer une accumulation de COL2A et affecter le développement et l'intégrité du squelette, comme cela a été montré dans des souris KI pour COL2A (Lewis et al., 2012). La capacité du COL2A à lier des facteurs de croissance et sa propre réactivité à des facteurs de croissance pourraient de plus entretenir un cercle vicieux dans des conditions pathologiques (Gouttenoire et al., 2010; Valcourt et al., 2003; Zhu et al., 1999). L'exposition aux PE affecterait alors l'état du squelette, non de façon spectaculaire comme dans des intoxications massives, mais à bas bruit, et pourraient être considérés comme des facteurs d'aggravation de certaines pathologies comme l'arthrose.

Conclusion générale

Perturbateurs Endocriniens et cartilage

Nos travaux ont comporté trois volets différents qui nous ont permis d'aborder la question de l'effet des perturbateurs endocriniens sur le cartilage selon trois points de vue différents.

1. *in vivo*, les PE ont un effet sur le développement du squelette à dose inférieure au NOAEL. Les effets observés se situent au niveau des vertèbres, évoquant les dysplasies épiphysaires d'origine génétique, secondaires à des mutations des gènes du collagène, y compris du collagène de type II. Au niveau tissulaire ces effets portent plus précisément sur le cartilage de croissance. Ces effets pourraient avoir des conséquences sur la qualité fonctionnelle des os au cours de la vieillesse, surtout chez l'homme dont le cartilage est « figé » par la fusion de la plaque de croissance à la puberté.
2. *In vitro*, dans le modèle cellulaire d'induction chondrogénique C1, nous montrons que les PE modulent la dynamique d'induction chondrogénique de façon ciblée sur la maturation du collagène de type2 sans modifier les autres marqueurs phénotypiques. Cet effet porte sur l'isoforme immature COL2A dont l'expression est prolongée au cours du temps, sans modifier la survenue et l'augmentation de l'expression de COL2B mature.
3. *In vitro*, dans un modèle de culture de chondrocytes différenciés ou dé-différenciés, nous montrons que les PE n'ont pas d'effet sur les chondrocytes différenciés, alors qu'ils stimulent COL2A dans des chondrocytes dédifférenciés. Cet effet dépend des récepteurs aux estrogènes (ER) et des voies p38-MAPK. Les PE pourraient donc agir par l'intermédiaire de l'ER α membranaire couplé au système cavéoline/p38.
Des effets similaires sont observés en présence de bFGF. L'utilisation d'un siRNA Anti-TIA-1 suggère que les effets spécifiques de bFGF sur COL2A pourraient être en partie médiés par la protéine du splicing TIA-1.

Les Perturbateurs Endocriniens ont donc un effet sur le développement du squelette et plus précisément sur son patron cartilagineux. Nous avons commencé l'étude mécanistique de ces effets, mais beaucoup reste à faire, notamment au plan des effets membranaires complexes que nous observons (ER et p38-MAPK).

La « toxicité mémorielle », une autre façon de concevoir la fenêtre d'exposition.

Les effets observés dans l'étude *in-vivo* sur la distance entre les apophyses transverses et sur la longueur des vertèbres chez les jeunes femelles (J30) sont transitoires : ils s'estompent à l'âge adulte (J110) (voir figures 25 et 26). La nature transitoire de ces effets chez le rat peut s'expliquer par la capacité des rongeurs à faire proliférer le cartilage la vie durant, la fusion de la plaque de croissance étant très ralentie, conduisant à la persistance de cette plaque la majeure partie de la vie. La production constante de chondrocytes permettrait alors de réparer les lésions en permanence. Chez l'homme en revanche, les dégâts causés à la matrice de collagène par les PE avant la puberté seraient conservés suite à la fusion de la plaque de croissance et pourraient se révéler ultérieurement à l'âge adulte, ou lors de la survenue de maladies du cartilage liées à l'âge, sous la forme d'une moindre résistance du cartilage aux processus pathologiques ou séniles. On pourrait alors parler de « toxicité mémorielle ». Ce concept de « toxicité mémorielle » est donc à ajouter aux idées que nous avons présentées au paragraphe 2 de l'introduction. Cette notion s'articule avec celle de fenêtre d'exposition : un effet toxique provoqué par une exposition à un moment crucial peut rester silencieux et ne se révéler que plus tard, voire même à la génération suivante. Cette idée n'est pas si nouvelle : c'est bien ce qui a eu lieu dans le cas du Diéthylstilbestrol. Nous voulons simplement souligner que la surveillance prolongée des animaux dans une expérience d'exposition doit devenir la règle des protocoles (vie durant, F2 puis F3).

Les résultats obtenus *in vitro* sur le modèle C1 soutiennent également cette hypothèse. Tous les composés testés ont montré un effet stimulant sur l'expression des messagers de Col2 autour de J18 (figure 32). Il en est de même pour l'expression de la protéine (figure 37). L'augmentation de COL2A dans les agrégats est maximale vers J18-J20 et jusqu'à J25, mais le ratio COL2B/2A revient à la normale à J36 (tableau 6). De plus, lorsque le processus de maturation est accéléré par l'hypoxie, les effets des PE disparaissent (figure 39).

Enfin, l'effet des PE sur l'expression du messenger de Col2A se limite aux chondrocytes dédifférenciés (P3) (figure 49). Ici encore, cela peut s'interpréter comme une phase sensible d'exposition : la vieillesse ou les maladies dégénératives du cartilage.

A l'inverse, nous n'avons pas observé d'effet potentiellement transgénérationnel chez les animaux F2. L'absence d'effets épigénétiques sur le tractus génital mâle pour la vinclozoline à haute dose (4 et 100 mg/kg/j) a déjà été rapportée (Schneider et al., 2013, 2008), en opposition au modèle du groupe de Skinner. La question reste donc ouverte.

Perspectives générales en Toxicologie

Sur le plan purement toxicologique, deux notions ressortent de notre travail :

Premièrement, les PE que nous avons utilisés à doses inférieures à leur NOAEL, montrent une activité. Il est donc évident que les NOAEL évalués sur des animaux adultes ne sont pas valables en toutes circonstances.

Si l'on considère la double « universalité » des PE et de l'incidence des maladies articulaires dégénératives (arthrose) ou inflammatoires (arthrite), les effets de ces composés doivent être surveillés de manière plus approfondie au niveau du développement pendant la période fœtale et la petite enfance.

Au cours de la vie, il existe des « fenêtres d'exposition » au cours desquels l'organisme est plus particulièrement sensible. Mais cela signifie aussi que chaque fenêtre importante d'exposition spécifique telle que vie fœtale, petite enfance immature (au plan du foie, du squelette, du système immunitaire et des organes sexuels) ou vieillesse doit mener à la définition d'un NOAEL spécifique. Les expositions *in utero* et lactationnelles telles le protocole que nous avons utilisé sont particulièrement aptes à cet effet, d'autant que leur prolongation aux générations suivantes permet d'aborder les hypothèses épigénétiques en croisant animaux exposés *in utero* et animaux naifs. **Il conviendra donc de réévaluer le NOAEL des PE en fonction de la fenêtre d'exposition.**

Deuxièmement, l'utilisation du micro-CT-Scan. Cette technique répond à la question du nombre critique d'animaux. En utilisant les méthodes traditionnelles (sacrifice et analyse), ces études deviennent rapidement difficiles à gérer par le nombre d'animaux nécessaires pour assurer la significativité statistique.

En revanche, la facilité de mise en œuvre du micro-CT-Scan sur des séries importantes, la **nature non-invasive de l'expérience**, l'obtention rapide et simultanée d'un grand nombre de paramètres morphologiques du squelette pouvant être traités ultérieurement et la possibilité d'analyser des rongeurs sauvages anesthésiés, sans même les sacrifier sont des avantages précieux.

Bibliographie

- AFSSA, 2005. Rapport “Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation” [WWW Document]. URL <http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/NUT-Sy-phytoestrogenes.pdf> (accessed 9.23.13).
- Aigner, T., Stöve, J., 2003. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1569–1593.
- Aigner, T., Zhu, Y., Chansky, H.H., Matsen, F.A., 3rd, Maloney, W.J., Sandell, L.J., 1999. Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 42, 1443–1450.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y., 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262, 5592–5595.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Soriano, S., García-Arévalo, M., Ripoll, C., Fuentes, E., Quesada, I., Nadal, Á., 2012. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 201–207.
- Anderson, J.J., Garner, S.C., 1998. Phytoestrogens and bone. *Baillière's Clin. Endocrinol. Metab.* 12, 543–557.
- Anway, M.D., Leathers, C., Skinner, M.K., 2006. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 147, 5515–5523.
- Anway, M.D., Skinner, M.K., 2008. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reprod. Biomed. Online* 16, 23–25.
- Araldi, E., Schipani, E., 2010. Hypoxia, HIFs and bone development. *Bone* 47, 190–196.
- Arnich, N., Canivenc-Lavier, M.-C., Kolf-Clauw, M., Coffigny, H., Cravedi, J.-P., Grob, K., Macherey, A.-C., Masset, D., Maximilien, R., Narbonne, J.-F., Nessler, F., Stadler, J., Tulliez, J., 2011. Conclusions of the French Food Safety Agency on the toxicity of bisphenol A. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 271–275.
- Aro, E., Khatri, R., Gerard-O'Riley, R., Mangiavini, L., Myllyharju, J., Schipani, E., 2012. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) but not HIF-2 is essential for hypoxic induction of collagen prolyl 4-hydroxylases in primary newborn mouse epiphyseal growth plate chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 37134–37144.
- Auger, J., Le Denmat, D., Berges, R., Doridot, L., Salmon, B., Canivenc-Lavier, M.C., Eustache, F., 2013. Environmental levels of oestrogenic and antiandrogenic compounds feminize digit ratios in male rats and their unexposed male progeny. *Proc. Biol. Sci.* 280, 20131532.
- Ballo, R., Beighton, P.H., Ramesar, R.S., 1998. Stickler-like syndrome due to a dominant negative mutation in the COL2A1 gene. *Am. J. Med. Genet.* 80, 6–11.
- Banerjee, D., Anderson, J.A., Taveras, N.A., González Della Valle, A., 2007. Bilateral total hip arthroplasty in siblings with Stickler Syndrome. *Hip Int. J. Clin. Exp. Res. Hip Pathol. Ther.* 17, 45–48.

- Bareggi, R., Grill, V., Sandrucci, M.A., Baldini, G., De Pol, A., Forabosco, A., Narducci, P., 1993. Developmental pathways of vertebral centra and neural arches in human embryos and fetuses. *Anat. Embryol. (Berl.)* 187, 139–144.
- Barrionuevo, F., Scherer, G., 2010. SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 433–436.
- Barron, V.A., Lou, H., 2012. Alternative splicing of the neurofibromatosis type I pre-mRNA. *Biosci. Rep.* 32, 131–138.
- Basilico, C., Moscatelli, D., 1992. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.* 59, 115–165.
- Behloul, N., Wu, G., 2013. Genistein: a promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 698, 31–38.
- Bennetau-Pelissero, C., Breton B, B., Bennetau, B., Corraze, G., Le Menn, F., Davail-Cuisset, B., Helou, C., Kaushik, S.J., 2001. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 173–187.
- Betancourt, A.M., Eltoum, I.A., Desmond, R.A., Russo, J., Lamartiniere, C.A., 2010. In utero exposure to bisphenol A shifts the window of susceptibility for mammary carcinogenesis in the rat. *Environ. Health Perspect.* 118, 1614–1619.
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* 22, 85–89.
- Billottet, C., Janji, B., Thiery, J.-P., Jouanneau, J., 2002. Rapid tumor development and potent vascularization are independent events in carcinoma producing FGF-1 or FGF-2. *Oncogene* 21, 8128–8139.
- Birnbaum, L.S., Fenton, S.E., 2003. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* 111, 389–394.
- Blanquet, P., 2012. Les signaux des FGF□: un mécanisme qui commence à être déchiffré. *médecine/sciences* 12, 303.
- Bluck, L.J., Bingham, S.A., 1997. Isoflavone content of breast milk and soy formulas: benefits and risks. *Clin. Chem.* 43, 851–852.
- Börjesson, A.E., Lagerquist, M.K., Liu, C., Shao, R., Windahl, S.H., Karlsson, C., Sjögren, K., Movérare-Skrtic, S., Antal, M.C., Krust, A., Mohan, S., Chambon, P., Sävendahl, L., Ohlsson, C., 2010. The role of estrogen receptor α in growth plate cartilage for longitudinal bone growth. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 25, 2690–2700.
- Börjesson, A.E., Lagerquist, M.K., Windahl, S.H., Ohlsson, C., 2013. The role of estrogen receptor α in the regulation of bone and growth plate cartilage. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.*
- Börjesson, A.E., Windahl, S.H., Karimian, E., Eriksson, E.E., Lagerquist, M.K., Engdahl, C., Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., Sävendahl, L., Ohlsson, C., 2012. The role of estrogen receptor- α and its activation function-1 for growth plate closure in female mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E1381–1389.
- Boyan, B.D., Schwartz, Z., 2004. Rapid vitamin D-dependent PKC signaling shares features with estrogen-dependent PKC signaling in cartilage and bone. *Steroids* 69, 591–597.
- Boyan, B.D., Sylvia, V.L., Dean, D.D., Schwartz, Z., 2001. 24,25-(OH)(2)D(3) regulates cartilage and bone via autocrine and endocrine mechanisms. *Steroids* 66, 363–374.
- Breinholt, V., Hossaini, A., Svendsen, G.W., Brouwer, C., Nielsen, E., 2000. Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor distribution,

- metabolism and bioavailability. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 38, 555–564.
- Bridgewater, L.C., Lefebvre, V., Crombrughe, B. de, 1998. Chondrocyte-specific Enhancer Elements in the Col11a2 Gene Resemble the Col2a1 Tissue-specific Enhancer. *J. Biol. Chem.* 273, 14998–15006.
- Brown, D.M., Nichols, B.E., Weingeist, T.A., Sheffield, V.C., Kimura, A.E., Stone, E.M., 1992. Procollagen II gene mutation in Stickler syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 110, 1589–1593.
- Burbidge, H.M., Thompson, K.C., Hodge, H., 1995. Post natal development of canine caudal cervical vertebrae. *Res. Vet. Sci.* 59, 35–40.
- Calafat, A.M., Kuklenyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J., Needham, L.L., 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* 113, 391–395.
- Cawston, T.E., Young, D.A., 2010. Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell Tissue Res.* 339, 221–235.
- Chadjichristos, C., Ghayor, C., Kypriotou, M., Martin, G., Renard, E., Ala-Kokko, L., Suske, G., de Crombrughe, B., Pujol, J.-P., Galéra, P., 2003. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 39762–39772.
- Chagin, A.S., Sävendahl, L., 2007. GPR30 estrogen receptor expression in the growth plate declines as puberty progresses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 4873–4877.
- Chakraborty, S., Combs, M.D., Yutzey, K.E., 2010. Transcriptional regulation of heart valve progenitor cells. *Pediatr. Cardiol.* 31, 414–421.
- Chang, H.C., Churchwell, M.I., Delclos, K.B., Newbold, R.R., Doerge, D.R., 2000. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J. Nutr.* 130, 1963–1970.
- Cheah, K.S., Stoker, N.G., Griffin, J.R., Grosveld, F.G., Solomon, E., 1985. Identification and characterization of the human type II collagen gene (COL2A1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 2555–2559.
- Chen, T.-L.L., Posey, K.L., Hecht, J.T., Vertel, B.M., 2008. COMP mutations: domain-dependent relationship between abnormal chondrocyte trafficking and clinical PSACH and MED phenotypes. *J. Cell. Biochem.* 103, 778–787.
- Christiansen, S., Scholze, M., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M., Axelstad, M., Kortenkamp, A., Hass, U., 2009. Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environ. Health Perspect.* 117, 1839–1846.
- Claassen, H., Briese, V., Manapov, F., Nebe, B., Schünke, M., Kurz, B., 2008. The phytoestrogens daidzein and genistein enhance the insulin-stimulated sulfate uptake in articular chondrocytes. *Cell Tissue Res.* 333, 71–79.
- Cocchi, D., Tulipano, G., Colciago, A., Sibilio, V., Pagani, F., Viganò, D., Rubino, T., Parolaro, D., Bonfanti, P., Colombo, A., Celotti, F., 2009. Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat: Part 1: Effects on somatic growth, growth hormone-axis activity and bone mass in the offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 237, 127–136.
- Corvol, M.T., 2000. The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 67, 557–560.

- Corvol, M.T., Carrascosa, A., Tsagris, L., Blanchard, O., Rappaport, R., 1987. Evidence for a direct in vitro action of sex steroids on rabbit cartilage cells during skeletal growth: influence of age and sex. *Endocrinology* 120, 1422–1429.
- Davies-Tuck, M.L., Wluka, A.E., Forbes, A., Wang, Y., English, D.R., Giles, G.G., Cicuttini, F., 2009. Smoking is associated with increased cartilage loss and persistence of bone marrow lesions over 2 years in community-based individuals. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 48, 1227–1231.
- Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L., Yang, Y., 2005. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* 8, 739–750.
- Dayani, N., Corvol, M.T., Robel, P., Eychenne, B., Monchamont, B., Tsagris, L., Rappaport, R., 1988. Estrogen receptors in cultured rabbit articular chondrocytes: influence of age. *J. Steroid Biochem.* 31, 351–356.
- Dean, D.D., Boyan, B.D., Schwartz, Z., Muniz, O.E., Carreno, M.R., Maeda, S., Howell, D.S., 2001. Effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24R,25-dihydroxyvitamin D₃ on metalloproteinase activity and cell maturation in growth plate cartilage in vivo. *Endocrine* 14, 311–323.
- Delezoide, A.L., Benoist-Lasselin, C., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A., Vekemans, M., Bonaventure, J., 1998. Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mech. Dev.* 77, 19–30.
- Demarquay, D., Dumontier, M.F., Tsagris, L., Bourguignon, J., Nataf, V., Corvol, M.T., 1990. In vitro insulin-like growth factor I interaction with cartilage cells derived from postnatal animals. *Horm. Res.* 33, 111–114; discussion 115.
- Den Hond, E., Schoeters, G., 2006. Endocrine disrupters and human puberty. *Int. J. Androl.* 29, 264–271; discussion 286–290.
- Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A., Leder, P., 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84, 911–921.
- Dias, M.S., 2007. Normal and abnormal development of the spine. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 18, 415–429.
- Diel, P., Hertrampf, T., Seibel, J., Laudénbach-Leschowsky, U., Kolba, S., Vollmer, G., 2006. Combinatorial effects of the phytoestrogen genistein and of estradiol in uterus and liver of female Wistar rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 60–70.
- Dixon, R.A., 2004. Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 225–261.
- Dong, W., Hinton, D.E., Kullman, S.W., 2012. TCDD disrupts hypural skeletogenesis during medaka embryonic development. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 125, 91–104.
- Donoso, L.A., Edwards, A.O., Frost, A.T., Ritter, R., 3rd, Ahmad, N., Vrabec, T., Rogers, J., Meyer, D., Parma, S., 2003. Clinical variability of Stickler syndrome: role of exon 2 of the collagen COL2A1 gene. *Surv. Ophthalmol.* 48, 191–203.
- Dorey, K., Amaya, E., 2010. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3731–3742.
- Du, F., Acland, G.M., Ray, J., 1998. Differential splicing of type II procollagen mRNA in canine retina. *Anim. Biotechnol.* 9, 15–20.
- Duan, Y., Turner, C.H., Kim, B.T., Seeman, E., 2001. Sexual dimorphism in vertebral fragility is more the result of gender differences in age-related bone gain than bone loss. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 16, 2267–2275.

- Duong, C.N., Ra, J.S., Cho, J., Kim, Sang D, Choi, H.K., Park, J.-H., Kim, K.W., Inam, E., Kim, Sang Don, 2010. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere* 78, 286–293.
- Dy, P., Wang, W., Bhattaram, P., Wang, Q., Wang, L., Ballock, R.T., Lefebvre, V., 2012. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev. Cell* 22, 597–609.
- Ellman, M.B., An, H.S., Muddasani, P., Im, H.-J., 2008. Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis. *Gene* 420, 82–89.
- El-Zawawy, H.B., Gill, C.S., Wright, R.W., Sandell, L.J., 2006. Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 24, 2150–2158.
- Eustache, F., Mondon, F., Canivenc-Lavier, M.C., Lesaffre, C., Fulla, Y., Berges, R., Cravedi, J.P., Vaiman, D., Auger, J., 2009. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ. Health Perspect.* 117, 1272–1279.
- Foster, J.W., Dominguez-Steglich, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanović, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D., Goodfellow, P.N., 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372, 525–530.
- Foster, W.G., Chan, S., Platt, L., Hughes, C.L., Jr, 2002. Detection of phytoestrogens in samples of second trimester human amniotic fluid. *Toxicol. Lett.* 129, 199–205.
- Fukui, N., McAlinden, A., Zhu, Y., Crouch, E., Broekelmann, T.J., Mecham, R.P., Sandell, L.J., 2002. Processing of type II procollagen amino propeptide by matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 277, 2193–2201.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J.M., Behringer, R.R., Nakamura, T., Uemoto, S., 2011. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* 43, 34–41.
- Gao, Y.H., Yamaguchi, M., 1999. Inhibitory effect of genistein on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Biochem. Pharmacol.* 58, 767–772.
- Garabedian, M., Lieberherr, M., N’Guyen, T.M., Corvol, M.T., Du Bois, M.B., Balsan, S., 1978. The in vitro production and activity of 24, 25-dihydroxycholecalciferol in cartilage and calvarium. *Clin. Orthop.* 241–248.
- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T., 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1531–1546.
- Genin, O., Hasdai, A., Shinder, D., Pines, M., 2012. The effect of inhibition of heat-shock proteins on thiram-induced tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.* 91, 1619–1626.
- Gladen, B.C., Rogan, W.J., Hardy, P., Thullen, J., Tingelstad, J., Tully, M., 1988. Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene transplacentally and through human milk. *J. Pediatr.* 113, 991–995.
- Goldring, M.B., 2012. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 4, 269–285.
- Goldring, M.B., Marcu, K.B., 2009. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 11, 224.

- Gospodarowicz, D., 1975. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.* 250, 2515–2520.
- Gospodarowicz, D., Moran, J.S., 1975. Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage cultures of human and murine fibroblasts. *J. Cell Biol.* 66, 451–457.
- Gouttenoire, J., Bougault, C., Aubert-Foucher, E., Perrier, E., Ronzière, M.-C., Sandell, L., Lundgren-Akerlund, E., Mallein-Gerin, F., 2010. BMP-2 and TGF-beta1 differentially control expression of type II procollagen and alpha 10 and alpha 11 integrins in mouse chondrocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 307–314.
- Gouttenoire J. et al., 2010. BMP-2 and TGF-β1 differentially control expression of type II procollagen and α10 and α11 integrins in mouse chondrocytes. *Eur J Cell Biol.* 2010 Apr;89(4):307-14. [WWW Document]. URL <http://www.sciencedirect.com.gate2.inist.fr/science/article/pii/S0171933510000063> (accessed 7.13.13).
- Gray, L.E., Jr, Ostby, J., 1998. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms. *Toxicol. Ind. Health* 14, 159–184.
- Gray, L.E., Ostby, J., Furr, J., Wolf, C.J., Lambright, C., Parks, L., Veeramachaneni, D.N., Wilson, V., Price, M., Hotchkiss, A., Orlando, E., Guillette, L., 2001. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum. Reprod. Update* 7, 248–264.
- Grogan, S.P., Miyaki, S., Asahara, H., D’Lima, D.D., Lotz, M.K., 2009. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11, R85.
- Grumbach, M.M., 2000. Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* 13 Suppl 6, 1439–1455.
- Guerrero-Bosagna, C., Savenkova, M., Haque, M.M., Nilsson, E., Skinner, M.K., 2013. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of altered Sertoli cell transcriptome and epigenome: molecular etiology of male infertility. *PloS One* 8, e59922.
- Haldin, C.E., LaBonne, C., 2010. SoxE factors as multifunctional neural crest regulatory factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 441–444.
- Hall, C.M., 2002. International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001). *Am. J. Med. Genet.* 113, 65–77.
- Hall CM., 2002. International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001). *Am J Med Genet.* 2002 Nov 15;113(1):65-77. [WWW Document]. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/ajmg.10828/abstract> (accessed 7.24.13).
- Han, Y., Lefebvre, V., 2008. L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4999–5013.
- Handorf, A.M., Li, W.-J., 2011. Fibroblast growth factor-2 primes human mesenchymal stem cells for enhanced chondrogenesis. *PloS One* 6, e22887.
- Hao, C., Cheng, X., Guo, J., Xia, H., Ma, X., 2013. Perinatal exposure to diethyl-hexyl-phthalate induces obesity in mice. *Front. Biosci. Elite Ed.* 5, 725–733.
- Hao, C.-J., Cheng, X.-J., Xia, H.-F., Ma, X., 2012. The endocrine disruptor diethylstilbestrol induces adipocyte differentiation and promotes obesity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263, 102–110.

- Harada, M., 1995. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 1–24.
- Hardingham, T.E., Fosang, A.J., 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 6, 861–870.
- Hass, U., Scholze, M., Christiansen, S., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M., Axelstad, M., Metzdorff, S.B., Kortenkamp, A., 2007. Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environ. Health Perspect.* 115 Suppl 1, 122–128.
- Hastrup, S.G., Chen, X., Bechtold, J.E., Kyle, R.F., Rahbek, O., Keyler, D.E., Skoett, M., Soeballe, K., 2010. Effect of nicotine and tobacco administration method on the mechanical properties of healing bone following closed fracture. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 28, 1235–1239.
- Hayes, A.J., Tudor, D., Nowell, M.A., Caterson, B., Hughes, C.E., 2008. Chondroitin sulfate sulfation motifs as putative biomarkers for isolation of articular cartilage progenitor cells. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 56, 125–138.
- Heinegård, D., Saxne, T., 2011. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 50–56.
- Hellwig, J., van Ravenzwaay, B., Mayer, M., Gembardt, C., 2000. Pre- and postnatal oral toxicity of vinclozolin in Wistar and Long-Evans rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* 32, 42–50.
- Hermesen, S.A.B., Larsson, S., Arima, A., Muneoka, A., Ihara, T., Sumida, H., Fukusato, T., Kubota, S., Yasuda, M., Lind, P.M., 2008. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects bone tissue in rhesus monkeys. *Toxicology* 253, 147–152.
- Hicks, D.G., O’Keefe, R.J., Reynolds, K.J., Cory-Slechta, D.A., Puzas, J.E., Judkins, A., Rosier, R.N., 1996. Effects of lead on growth plate chondrocyte phenotype. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 164–172.
- Høidrup, S., Prescott, E., Sørensen, T.I., Gottschau, A., Lauritzen, J.B., Schroll, M., Grønbaek, M., 2000. Tobacco smoking and risk of hip fracture in men and women. *Int. J. Epidemiol.* 29, 253–259.
- Holz, J.D., Beier, E., Sheu, T.-J., Ubayawardena, R., Wang, M., Sampson, E.R., Rosier, R.N., Zuscik, M., Puzas, J.E., 2012. Lead induces an osteoarthritis-like phenotype in articular chondrocytes through disruption of TGF- β signaling. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 30, 1760–1766.
- Hooshmand, S., Soung, D.Y., Lucas, E.A., Madhally, S.V., Levenson, C.W., Arjmandi, B.H., 2007. Genistein reduces the production of proinflammatory molecules in human chondrocytes. *J. Nutr. Biochem.* 18, 609–614.
- Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Wilson, V.S., Ryan, B.C., Gray, L.E., Jr, 2008. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 102, 371–382.
- Hunter, I., McGregor, D., Robins, S.P., 2001. Caspase-dependent cleavage of cadherins and catenins during osteoblast apoptosis. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 16, 466–477.

- Hunziker, E.B., Wagner, J., Zapf, J., 1994. Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *J. Clin. Invest.* 93, 1078–1086.
- Hwang, J.K., Min, K.H., Choi, K.H., Hwang, Y.C., Jeong, I.-K., Ahn, K.J., Chung, H.-Y., Chang, J.S., 2013. Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. *Life Sci.* 93, 367–372.
- Iguchi, T., Watanabe, H., Katsu, Y., Mizutani, T., Miyagawa, S., Suzuki, A., Kohno, S., Sone, K., Kato, H., 2002. Developmental toxicity of estrogenic chemicals on rodents and other species. *Congenit. Anom.* 42, 94–105.
- Im, H.-J., Muddasani, P., Natarajan, V., Schmid, T.M., Block, J.A., Davis, F., van Wijnen, A.J., Loeser, R.F., 2007. Basic fibroblast growth factor stimulates matrix metalloproteinase-13 via the molecular cross-talk between the mitogen-activated protein kinases and protein kinase Cdelta pathways in human adult articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 11110–11121.
- Im HJ. et al., 2007. Basic fibroblast growth factor stimulates matrix metalloproteinase-13 via the molecular cross-talk between the mitogen-activated protein kinases and protein kinase Cdelta pathways in human adult articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 2007 Apr 13;282(15):11110-21. [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/17311929> (accessed 9.27.13).
- Irvine, C.H., Fitzpatrick, M.G., Alexander, S.L., 1998. Phytoestrogens in soy-based infant foods: concentrations, daily intake, and possible biological effects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 217, 247–253.
- Itoh, K., Yaoi, T., Fushiki, S., 2012. Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 32, 447–457.
- Itoh, N., Ornitz, D.M., 2011. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem. (Tokyo)* 149, 121–130.
- Ivell, R., Heng, K., Nicholson, H., Anand-Ivell, R., 2013. Brief maternal exposure of rats to the xenobiotics dibutyl phthalate or diethylstilbestrol alters adult-type Leydig cell development in male offspring. *Asian J. Androl.* 15, 261–268.
- Iwamuro, S., Sakakibara, M., Terao, M., Ozawa, A., Kurobe, C., Shigeura, T., Kato, M., Kikuyama, S., 2003. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 189–198.
- Jedeon, K., De la Dure-Molla, M., Brookes, S.J., Loiodice, S., Marciano, C., Kirkham, J., Canivenc-Lavier, M.-C., Boudalia, S., Bergès, R., Harada, H., Berdal, A., Babajko, S., 2013. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *Am. J. Pathol.* 183, 108–118.
- Jeng, Y.-J., Kochukov, M.Y., Watson, C.S., 2009. Membrane estrogen receptor-alpha-mediated nongenomic actions of phytoestrogens in GH3/B6/F10 pituitary tumor cells. *J. Mol. Signal.* 4, 2.
- Kannu, P., Bateman, J., Savarirayan, R., 2012. Clinical phenotypes associated with type II collagen mutations. *J. Paediatr. Child Health* 48, E38–43.
- Kebir, O., Krebs, M.-O., 2012. Diethylstilbestrol and risk of psychiatric disorders: a critical review and new insights. *World J. Biol. Psychiatry Off. J. World Fed. Soc. Biol. Psychiatry* 13, 84–95.
- Kelce, W.R., Lambright, C.R., Gray, L.E., Jr, Roberts, K.P., 1997. Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 192–200.

- Kellermann, O., Buc-Caron, M.H., Marie, P.J., Lamblin, D., Jacob, F., 1990. An immortalized osteogenic cell line derived from mouse teratocarcinoma is able to mineralize in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* 110, 123–132.
- Kilkenny, D.M., Hill, D.J., 1996. Perinuclear localization of an intracellular binding protein related to the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 is temporally associated with the nuclear trafficking of FGF-2 in proliferating epiphyseal growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 137, 5078–5089.
- Knudson, C.B., Knudson, W., 2001. Cartilage proteoglycans. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 69–78.
- Korach, K.S., McLachlan, J.A., 1985. The role of the estrogen receptor in diethylstilbestrol toxicity. *Arch. Toxicol. Suppl. Arch. Für Toxikol. Suppl.* 8, 33–42.
- Kortenkamp, A., 2007. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 115 Suppl 1, 98–105.
- Kortenkamp, A., 2008. Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. *Int. J. Androl.* 31, 233–240.
- Kristensen, P., Irgens, L.M., Andersen, A., Bye, A.S., Sundheim, L., 1997. Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991. *Epidemiol. Camb. Mass* 8, 537–544.
- Kronenberg, H.M., 2007. The role of the perichondrium in fetal bone development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1116, 59–64.
- Krüger, T., Long, M., Bonefeld-Jørgensen, E.C., 2008. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 246, 112–123.
- Kubo, K., Arai, O., Ogata, R., Omura, M., Hori, T., Aou, S., 2001. Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 304, 73–76.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870.
- Kundakovic, M., Champagne, F.A., 2011. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain. Behav. Immun.* 25, 1084–1093.
- Kung, M.H., Yukata, K., O’Keefe, R.J., Zuscik, M.J., 2012. Aryl hydrocarbon receptor-mediated impairment of chondrogenesis and fracture healing by cigarette smoke and benzo(a)pyrene. *J. Cell. Physiol.* 227, 1062–1070.
- Kurosawa, T., Hiroi, H., Tsutsumi, O., Ishikawa, T., Osuga, Y., Fujiwara, T., Inoue, S., Muramatsu, M., Momoeda, M., Taketani, Y., 2002. The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocr. J.* 49, 465–471.
- Larraín, J., Bachiller, D., Lu, B., Agius, E., Piccolo, S., De Robertis, E.M., 2000. BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Dev. Camb. Engl.* 127, 821–830.
- Lauver, D., Nelles, K.K., Hanson, K., 2005. The health effects of diethylstilbestrol revisited. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs. JOGNN NAACOG* 34, 494–499.
- Leblanc, J.-C., Guérin, T., Noël, L., Calamassi-Tran, G., Volatier, J.-L., Verger, P., 2005. Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French Total Diet Study. *Food Addit. Contam.* 22, 624–641.

- Lee, D.-H., Steffes, M., Jacobs, D.R., 2007. Positive associations of serum concentration of polychlorinated biphenyls or organochlorine pesticides with self-reported arthritis, especially rheumatoid type, in women. *Environ. Health Perspect.* 115, 883–888.
- Lee, H.-G., Yang, J.-H., 2010. PKC- δ mediates TCDD-induced apoptosis of chondrocyte in ROS-dependent manner. *Chemosphere* 81, 1039–1044.
- Lefebvre, V., Bhattaram, P., 2010. Vertebrate skeletogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 90, 291–317.
- Lefebvre, V., Li, P., de Crombrughe, B., 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 17, 5718–5733.
- Leung, A.W.L., Wong, S.Y.Y., Chan, D., Tam, P.P.L., Cheah, K.S.E., 2010. Loss of procollagen IIA from the anterior mesendoderm disrupts the development of mouse embryonic forebrain. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 2319–2329.
- Lewis, R., Ravindran, S., Wirthlin, L., Traeger, G., Fernandes, R.J., McAlinden, A., 2012. Disruption of the developmentally-regulated Col2a1 pre-mRNA alternative splicing switch in a transgenic knock-in mouse model. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 31, 214–226.
- Liao, M.-H., Tai, Y.-T., Cherng, Y.-G., Liu, S.-H., Chang, Y.-A., Lin, P.-I., Chen, R.-M., 2013. Genistein induces oestrogen receptor- α gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinases/NF- κ B/activator protein-1 and promotes cell mineralisation. *Br. J. Nutr.* 1–9.
- Lin, S., Marshall, E.G., Davidson, G.K., 1994. Potential parental exposure to pesticides and limb reduction defects. *Scand. J. Work. Environ. Health* 20, 166–179.
- Locker, M., Kellermann, O., Boucquey, M., Khun, H., Huerre, M., Poliard, A., 2004. Paracrine and autocrine signals promoting full chondrogenic differentiation of a mesoblastic cell line. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 19, 100–110.
- Lui, V.C., Ng, L.J., Nicholls, J., Tam, P.P., Cheah, K.S., 1995. Tissue-specific and differential expression of alternatively spliced alpha 1(II) collagen mRNAs in early human embryos. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 203, 198–211.
- Lundgren, M.S., Novak, P.J., 2009. Quantification of phytoestrogens in industrial waste streams. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 28, 2318–2323.
- Mackie, E.J., Tatarczuch, L., Mirams, M., 2011. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J. Endocrinol.* 211, 109–121.
- Malinin, T., Ouellette, E.A., 2000. Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 8, 483–491.
- Mallein-Gerin, F., van der Rest, M., 2012. La culture de chondrocytes : outil d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage. *médecine/sciences* 12, 1087.
- Mancilla, E.E., De Luca, F., Uyeda, J.A., Czerwiec, F.S., Baron, J., 1998. Effects of fibroblast growth factor-2 on longitudinal bone growth. *Endocrinology* 139, 2900–2904.
- Maroudas, A., Bayliss, M.T., Uchitel-Kaushansky, N., Schneiderman, R., Gilav, E., 1998. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch. Biochem. Biophys.* 350, 61–71.

- Martin, P.M., Horwitz, K.B., Ryan, D.S., McGuire, W.L., 1978. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 103, 1860–1867.
- Matsuo, I., Kimura-Yoshida, C., 2013. Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 399–407.
- Matthews, J.B., Twomey, K., Zacharewski, T.R., 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149–157.
- McAlinden, A., Liang, L., Mukudai, Y., Imamura, T., Sandell, L.J., 2007. Nuclear protein TIA-1 regulates COL2A1 alternative splicing and interacts with precursor mRNA and genomic DNA. *J. Biol. Chem.* 282, 24444–24454.
- McLachlan, J.A., Dixon, R.L., 1977. Toxicologic comparisons of experimental and clinical exposure to diethylstilbestrol during gestation. *Adv. Sex Horm. Res.* 3, 309–336.
- McMartin, K.E., Kennedy, K.A., Greenspan, P., Alam, S.N., Greiner, P., Yam, J., 1978. Diethylstilbestrol: a review of its toxicity and use as a growth promotant in food-producing animals. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1, 279–313.
- Menegola, E., Broccia, M.L., Di Renzo, F., Massa, V., Giavini, E., 2005. Craniofacial and axial skeletal defects induced by the fungicide triadimefon in the mouse. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 74, 185–195.
- Metsäranta, M., Toman, D., de Crombrughe, B., Vuorio, E., 1991. Mouse type II collagen gene. Complete nucleotide sequence, exon structure, and alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 266, 16862–16869.
- Meyer, J., Südbeck, P., Held, M., Wagner, T., Schmitz, M.L., Bricarelli, F.D., Eggermont, E., Friedrich, U., Haas, O.A., Kobelt, A., Leroy, J.G., Van Maldergem, L., Michel, E., Mitulla, B., Pfeiffer, R.A., Schinzel, A., Schmidt, H., Scherer, G., 1997. Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Hum. Mol. Genet.* 6, 91–98.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M.C., Ornitz, D.M., Vortkamp, A., 2002. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell* 3, 439–449.
- Misawa, M., Doull, J., Uyeki, E.M., 1982. Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. III. Development of cartilage and bone. *J. Toxicol. Environ. Health* 10, 551–563.
- Molina-Molina, J.-M., Hillenweck, A., Jouanin, I., Zalko, D., Cravedi, J.-P., Fernández, M.-F., Pillon, A., Nicolas, J.-C., Olea, N., Balaguer, P., 2006. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 44–54.
- Montero, A., Okada, Y., Tomita, M., Ito, M., Tsurukami, H., Nakamura, T., Doetschman, T., Coffin, J.D., Hurley, M.M., 2000. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J. Clin. Invest.* 105, 1085–1093.
- Moore, R.W., Jefcoate, C.R., Peterson, R.E., 1991. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits steroidogenesis in the rat testis by inhibiting the mobilization of cholesterol to cytochrome P450_{scc}. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109, 85–97.
- Morishima, A., Grumbach, M.M., Simpson, E.R., Fisher, C., Qin, K., 1995. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 3689–3698.
- Muir, H., 1978. Proteoglycans of cartilage. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.)* 12, 67–81.

- Murphy, G., Nagase, H., 2008. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med.* 29, 290–308.
- Naciff, J.M., Hess, K.A., Overmann, G.J., Torontali, S.M., Carr, G.J., Tiesman, J.P., Foertsch, L.M., Richardson, B.D., Martinez, J.E., Daston, G.P., 2005. Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17{alpha}-ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 86, 396–416.
- Nah, H.D., Swoboda, B., Birk, D.E., Kirsch, T., 2001. Type IIA procollagen: expression in developing chicken limb cartilage and human osteoarthritic articular cartilage. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 220, 307–322.
- Nakajima, F., Ogasawara, A., Goto, K., Moriya, H., Ninomiya, Y., Einhorn, T.A., Yamazaki, M., 2001. Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 19, 935–944.
- Nakashima, M., Eguchi, K., Aoyagi, T., Yamashita, I., Ida, H., Sakai, M., Shimada, H., Kawabe, Y., Nagataki, S., Koji, T., 1994. Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis: detection by immunohistological staining and in situ hybridisation. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 45–50.
- Nataf, V., Tsagris, L., Dumontier, M.F., Bonaventure, J., Corvol, M., 1990. Modulation of sulfated proteoglycan synthesis and collagen gene expression by chondrocytes grown in the presence of bFGF alone or combined with IGF1. *Reprod. Nutr. Dev.* 30, 331–342.
- Newbold, R.R., 2004. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 199, 142–150.
- Newbold, R.R., 2008. Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES). *Fertil. Steril.* 89, e55–56.
- Ngo, A.D., Taylor, R., Roberts, C.L., Nguyen, T.V., 2006. Association between Agent Orange and birth defects: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* 35, 1220–1230.
- Nikopoulos, K., Schrauwen, I., Simon, M., Collin, R.W.J., Veckeneer, M., Keymolen, K., Van Camp, G., Cremers, F.P.M., van den Born, L.I., 2011. Autosomal recessive Stickler syndrome in two families is caused by mutations in the COL9A1 gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 4774–4779.
- Nilsson, E., Larsen, G., Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C., Savenkova, M.I., Skinner, M.K., 2012. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian disease. *PloS One* 7, e36129.
- Nilsson, O., Chrysis, D., Pajulo, O., Boman, A., Holst, M., Rubinstein, J., Martin Ritzén, E., Sävendahl, L., 2003. Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages. *J. Endocrinol.* 177, 319–326.
- Nishiyama, T., Hatano, H., Kurosaka, M., Bolander, M.E., Sarkar, G., 2003. Cis-acting intronic elements that regulate cartilage-specific alternative splicing of the type II collagen (Col2) pre-mRNA lie at or near splice site junction sequences flanking exon 2 of the gene. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 18, 1716–1722.
- Okada-Ban, M., Thiery, J.P., Jouanneau, J., 2000. Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 263–267.
- Okazaki, R., Sakai, A., Nakamura, T., Kunugita, N., Norimura, T., Suzuki, K., 1996. Effects of transforming growth factor beta s and basic fibroblast growth factor on articular

- chondrocytes obtained from immobilised rabbit knees. *Ann. Rheum. Dis.* 55, 181–186.
- Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., Sonnenschein, C., 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* 104, 298–305.
- Ornitz, D.M., Marie, P.J., 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 16, 1446–1465.
- Oz, O.K., Millsaps, R., Welch, R., Birch, J., Zerwekh, J.E., 2001. Expression of aromatase in the human growth plate. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 249–253.
- Paik, M.-K., Lee, H.-O., Chung, H.-S., Yang, S.-O., Kim, J.-H., Om, A.-S., 2003. Genistein may prevent cadmium-induced bone loss in ovariectomized rats. *J. Med. Food* 6, 337–343.
- Patisaul, H.B., Jefferson, W., 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 400–419.
- Perrier, E., Ronzière, M.-C., Bareille, R., Pinzano, A., Mallein-Gerin, F., Freyria, A.-M., 2011. Analysis of collagen expression during chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Lett.* 33, 2091–2101.
- Petrelli, G., Mantovani, A., 2002. Environmental risk factors and male fertility and reproduction. *Contraception* 65, 297–300.
- Pfitscher, A., Reiter, E., Jungbauer, A., 2008. Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 112, 87–94.
- Phrakonkham, P., Chevalier, J., Desmetz, C., Pinnert, M.-F., Bergès, R., Jover, E., Davicco, M.-J., Bennetau-Pelissero, C., Coxam, V., Artur, Y., Canivenc-Lavier, M.-C., 2007. Isoflavonoid-based bone-sparing treatments exert a low activity on reproductive organs and on hepatic metabolism of estradiol in ovariectomized rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224, 105–115.
- Pogue, R., Lyons, K., 2006. BMP signaling in the cartilage growth plate. *Curr. Top. Dev. Biol.* 76, 1–48.
- Poliard, A., Ronzière, M.C., Freyria, A.M., Lamblin, D., Herbage, D., Kellermann, O., 1999. Lineage-dependent collagen expression and assembly during osteogenic or chondrogenic differentiation of a mesoblastic cell line. *Exp. Cell Res.* 253, 385–395.
- Presta, M., Dell’Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., Rusnati, M., 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 159–178.
- Prins, G.S., Tang, W.-Y., Belmonte, J., Ho, S.-M., 2008. Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102, 134–138.
- Rasaputra, K.S., Liyanage, R., Lay, J.O., Jr, Slavik, M.F., Rath, N.C., 2013. Effect of thiram on avian growth plate chondrocytes in culture. *J. Toxicol. Sci.* 38, 93–101.
- Rath, N.C., Huff, W.E., Huff, G.R., 2007. Thiram-induced changes in the expression of genes relating to vascularization and tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.* 86, 2390–2395.
- Reardon, A., Sandell, L., Jones, C.J., McLeod, D., Bishop, P.N., 2000. Localization of pN-type IIA procollagen on adult bovine vitreous collagen fibrils. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 19, 169–173.

- Richards, A.J., Martin, S., Yates, J.R., Scott, J.D., Baguley, D.M., Pope, F.M., Snead, M.P., 2000. COL2A1 exon 2 mutations: relevance to the Stickler and Wagner syndromes. *Br. J. Ophthalmol.* 84, 364–371.
- Richette, P., Dumontier, M.-F., Tahiri, K., Widerak, M., Torre, A., Benallaoua, M., Benallaloua, M., Rannou, F., Corvol, M.-T., Savouret, J.-F., 2007. Oestrogens inhibit interleukin 1beta-mediated nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes through nuclear factor-kappa B impairment. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 345–350.
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 24, 199–224.
- Roman-Blas, J.A., Castañeda, S., Largo, R., Herrero-Baumont, G., 2009. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res. Ther.* 11, 241.
- Ronis, M.J., Aronson, J., Gao, G.G., Hogue, W., Skinner, R.A., Badger, T.M., Lumpkin, C.K., Jr, 2001. Skeletal effects of developmental lead exposure in rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 62, 321–329.
- Rosenberg Zand, R.S., Jenkins, D.J., Diamandis, E.P., 2000. Genistein: a potent natural antiandrogen. *Clin. Chem.* 46, 887–888.
- Rosenfeld, C.S., 2012. Effects of maternal diet and exposure to bisphenol A on sexually dimorphic responses in conceptuses and offspring. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 47 Suppl 4, 23–30.
- Roughley, P.J., 2006. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur. Cell. Mater.* 12, 92–101.
- Rousseau, J.-C., Zhu, Y., Miossec, P., Vignon, E., Sandell, L.J., Garner, P., Delmas, P.D., 2004. Serum levels of type IIA procollagen amino terminal propeptide (PIIANP) are decreased in patients with knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis. Cartil. OARS Osteoarthritis. Res. Soc.* 12, 440–447.
- Rucinski, M., Ziolkowska, A., Hochol, A., Pucher, A., Macchi, C., Belloni, A.S., Nussdorfer, G.G., Malendowicz, L.K., 2006. Estradiol and resveratrol stimulating effect on osteocalcin, but not osteonectin and collagen-1alpha gene expression in primary culture of rat calvarial osteoblast-like cells. *Int. J. Mol. Med.* 18, 565–570.
- Ryan, M.C., Sandell, L.J., 1990. Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *J. Biol. Chem.* 265, 10334–10339.
- Ryan, M.C., Sieraski, M., Sandell, L.J., 1990. The human type II procollagen gene: identification of an additional protein-coding domain and location of potential regulatory sequences in the promoter and first intron. *Genomics* 8, 41–48.
- Safe, S., Wormke, M., Samudio, I., 2000. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 295–306.
- Sajiki, J., Takahashi, K., Yonekubo, J., 1999. Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 736, 255–261.
- Sakai, T., Kogiso, M., 2008. Soy isoflavones and immunity. *J. Med. Investig. JMI* 55, 167–173.
- Salentey, V., Claus, S., Bougault, C., Paumier, A., Aubert-Foucher, E., Perrier-Groult, E., Ronzière, M.-C., Freyria, A.-M., Galéra, P., Beauchef, G., Duterque-Coquillaud, M., Piperno, M., Damour, O., Herbage, B., Mallein-Gerin, F., 2009. [Human chondrocyte

- responsiveness to bone morphogenetic protein-2 after their in vitro dedifferentiation: potential use of bone morphogenetic protein-2 for cartilage cell therapy]. *Pathol. Biol.* (Paris) 57, 282–289.
- Salminen, H., Vuorio, E., Säämänen, A.M., 2001. Expression of Sox9 and type IIA procollagen during attempted repair of articular cartilage damage in a transgenic mouse model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 44, 947–955.
- Sandell, L.J., 1994. In situ expression of collagen and proteoglycan genes in notochord and during skeletal development and growth. *Microsc. Res. Tech.* 28, 470–482.
- Sandell, L.J., Morris, N., Robbins, J.R., Goldring, M.B., 1991. Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *J. Cell Biol.* 114, 1307–1319.
- Sandell, L.J., Nalin, A.M., Reife, R.A., 1994. Alternative splice form of type II procollagen mRNA (IIA) is predominant in skeletal precursors and non-cartilaginous tissues during early mouse development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 199, 129–140.
- Sangiorgi, F.O., Benson-Chanda, V., de Wet, W.J., Sobel, M.E., Tsipouras, P., Ramirez, F., 1985. Isolation and partial characterization of the entire human pro alpha 1(II) collagen gene. *Nucleic Acids Res.* 13, 2207–2225.
- Santell, R.C., Chang, Y.C., Nair, M.G., Helferich, W.G., 1997. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J. Nutr.* 127, 263–269.
- Savontaus, M., Ihanamäki, T., Metsäranta, M., Vuorio, E., Sandberg-Lall, M., 1997. Localization of type II collagen mRNA isoforms in the developing eyes of normal and transgenic mice with a mutation in type II collagen gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 930–942.
- Schipani, E., 2010. Posttranslational modifications of collagens as targets of hypoxia and Hif-1alpha in endochondral bone development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192, 317–321.
- Schmid, G.J., Kobayashi, C., Sandell, L.J., Ornitz, D.M., 2009. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 766–774.
- Schneider, S., Kaufmann, W., Buesen, R., van Ravenzwaay, B., 2008. Vinclozolin--the lack of a transgenerational effect after oral maternal exposure during organogenesis. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 25, 352–360.
- Schneider, S., Marxfeld, H., Gröters, S., Buesen, R., van Ravenzwaay, B., 2013. Vinclozolin--no transgenerational inheritance of anti-androgenic effects after maternal exposure during organogenesis via the intraperitoneal route. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 37, 6–14.
- Schrager, S., Potter, B.E., 2004. Diethylstilbestrol exposure. *Am. Fam. Physician* 69, 2395–2400.
- Schwartz, D.A., LoGerfo, J.P., 1988. Congenital limb reduction defects in the agricultural setting. *Am. J. Public Health* 78, 654–658.
- Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J.A., Fiddes, J.C., Gospodarowicz, D., 1987. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325, 257–259.
- Sekizawa, J., 2008. Low-dose effects of bisphenol A: a serious threat to human health? *J. Toxicol. Sci.* 33, 389–403.

- Sharif, M., Kirwan, J., Charni, N., Sandell, L.J., Whittles, C., Garnero, P., 2007. A 5-yr longitudinal study of type IIA collagen synthesis and total type II collagen degradation in patients with knee osteoarthritis--association with disease progression. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 46, 938–943.
- Shelnutt, S.R., Cimino, C.O., Wiggins, P.A., Ronis, M.J.J., Badger, T.M., 2002. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 588–594.
- Shibata, F., Baird, A., Florkiewicz, R.Z., 1991. Functional characterization of the human basic fibroblast growth factor gene promoter. *Growth Factors Chur Switz.* 4, 277–287.
- Sierra-Santoyo, A., Angeles-Soto, E., de Lourdes López-González, M., Harrison, R.A., Hughes, M.F., 2012. In vitro metabolism of the anti-androgenic fungicide vinclozolin by rat liver microsomes. *Arch. Toxicol.* 86, 413–421.
- Singh, S., Li, S.S.-L., 2012. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 10143–10153.
- Smith, E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahashi, H., Cohen, R.M., Specker, B., Williams, T.C., Lubahn, D.B., Korach, K.S., 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.* 331, 1056–1061.
- Snead, M., Richards, A., 2002. A frame shift mutation in a tissue-specific alternatively spliced exon of collagen 2A1 in Wagner's vitreoretinal degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 134, 473; author reply 473–474.
- Spranger, J., Menger, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., 1994. Kniest dysplasia is caused by dominant collagen II (COL2A1) mutations: parental somatic mosaicism manifesting as Stickler phenotype and mild spondyloepiphyseal dysplasia. *Pediatr. Radiol.* 24, 431–435.
- Steinhardt, G.F., 2004. Endocrine disruption and hypospadias. *Adv. Exp. Med. Biol.* 545, 203–215.
- Stheneur, C., Dumontier, M.-F., Guedes, C., Fulchignoni-Lataud, M.-C., Tahiri, K., Karsenty, G., Corvol, M.T., 2003. Basic fibroblast growth factor as a selective inducer of matrix Gla protein gene expression in proliferative chondrocytes. *Biochem. J.* 369, 63–70.
- Stockwell, R.A., 1978. Chondrocytes. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.)* 12, 7–13.
- Strickland, A.L., Sprinz, H., 1973. Studies of the influence of estradiol and growth hormone on the hypophysectomized immature rat epiphyseal cartilage growth plate. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 115, 471–477.
- Sugimoto, E., Yamaguchi, M., 2000. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int. J. Mol. Med.* 5, 515–520.
- Suleman, F., Gualeni, B., Gregson, H.J., Leighton, M.P., Piróg, K.A., Edwards, S., Holden, P., Boot-Handford, R.P., Briggs, M.D., 2012. A novel form of chondrocyte stress is triggered by a COMP mutation causing pseudoachondroplasia. *Hum. Mutat.* 33, 218–231.
- Sullivan, R., Klagsbrun, M., 1985. Purification of cartilage-derived growth factor by heparin affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 260, 2399–2403.
- Sylvia, V.L., Boyan, B.D., Dean, D.D., Schwartz, Z., 2000. The membrane effects of 17 β -estradiol on chondrocyte phenotypic expression are mediated by activation of protein kinase C through phospholipase C and G-proteins. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 73, 211–224.

- Sylvia, V.L., Hughes, T., Dean, D.D., Boyan, B.D., Schwartz, Z., 1998. 17beta-estradiol regulation of protein kinase C activity in chondrocytes is sex-dependent and involves nongenomic mechanisms. *J. Cell. Physiol.* 176, 435–444.
- Szpinda, M., Baumgart, M., Szpinda, A., Woźniak, A., Małkowski, B., Wiśniewski, M., Mila-Kierzenkowska, C., Króliczewski, D., 2013. Cross-sectional study of the ossification center of the C1-S5 vertebral bodies. *Surg. Radiol. Anat. SRA* 35, 395–402.
- Takahashi, Y., Lavigne, J.A., Hursting, S.D., Chandramouli, G.V.R., Perkins, S.N., Barrett, J.C., Wang, T.T.Y., 2004. Using DNA microarray analyses to elucidate the effects of genistein in androgen-responsive prostate cancer cells: identification of novel targets. *Mol. Carcinog.* 41, 108–119.
- Takeuchi, T., Tsutsumi, O., 2002. Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 76–78.
- Tamamura, Y., Otani, T., Kanatani, N., Koyama, E., Kitagaki, J., Komori, T., Yamada, Y., Costantini, F., Wakisaka, S., Pacifici, M., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., 2005. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* 280, 19185–19195.
- Tan, W., Huang, H., Wang, Y., Wong, T.Y., Wang, C.C., Leung, L.K., 2013. Bisphenol A differentially activates protein kinase C isoforms in murine placental tissue. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 269, 163–168.
- Terkeltaub, R.A., Johnson, K., Rohnow, D., Goomer, R., Burton, D., Deftos, L.J., 1998. Bone morphogenetic proteins and bFGF exert opposing regulatory effects on PTHrP expression and inorganic pyrophosphate elaboration in immortalized murine endochondral hypertrophic chondrocytes (MCT cells). *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 13, 931–941.
- Thoms, B.L., Dudek, K.A., Lafont, J.E., Murphy, C.L., 2013. Hypoxia promotes the production and inhibits the destruction of human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 65, 1302–1312.
- Tiller, G.E., Weis, M.A., Polumbo, P.A., Gruber, H.E., Rimoin, D.L., Cohn, D.H., Eyre, D.R., 1995. An RNA-splicing mutation (G+5IVS20) in the type II collagen gene (COL2A1) in a family with spondyloepiphyseal dysplasia congenita. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 388–395.
- Toda, K., Miyaura, C., Okada, T., Shizuta, Y., 2002. Dietary bisphenol A prevents ovarian degeneration and bone loss in female mice lacking the aromatase gene (Cyp19). *Eur. J. Biochem. FEBS* 269, 2214–2222.
- Tomes, C.N., Roggero, C.M., De Blas, G., Saling, P.M., Mayorga, L.S., 2004. Requirement of protein tyrosine kinase and phosphatase activities for human sperm exocytosis. *Dev. Biol.* 265, 399–415.
- Trapphoff, T., Heiligentag, M., El Hajj, N., Haaf, T., Eichenlaub-Ritter, U., 2013. Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertil. Steril.*
- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Thomas, B.F., Keimowitz, A.R., Brine, D.R., Veselica, M.M., Fail, P.A., Chang, T.Y., Seely, J.C., Joiner, R.L., Butala, J.H., Dimond, S.S., Cagen, S.Z., Shiotsuka, R.N., Stropp, G.D., Waechter, J.M., 2002. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 68, 121–146.

- Valcourt, U., Gouttenoire, J., Aubert-Foucher, E., Herbage, D., Mallein-Gerin, F., 2003. Alternative splicing of type II procollagen pre-mRNA in chondrocytes is oppositely regulated by BMP-2 and TGF-beta1. *FEBS Lett.* 545, 115–119.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* Elmsford N 24, 139–177.
- Vanderschueren, D., Vandenput, L., Boonen, S., Lindberg, M.K., Bouillon, R., Ohlsson, C., 2004. Androgens and bone. *Endocr. Rev.* 25, 389–425.
- Vincent, T., Saklatvala, J., 2006. Basic fibroblast growth factor: an extracellular mechanotransducer in articular cartilage? *Biochem. Soc. Trans.* 34, 456–457.
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., Dekant, W., 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1281–1287.
- Vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Coe, B.L., Angle, B.M., Taylor, J.A., 2012. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354, 74–84.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F.D., Keutel, J., Hustert, E., Wolf, U., Tommerup, N., Schempp, W., Scherer, G., 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79, 1111–1120.
- Wang, K.-C., Lin, Y.-F., Qin, C.-H., Chen, T.-L., Chen, C.-H., 2010. Bisphenol-A interferes with estradiol-mediated protection in osteoarthritic chondrocytes. *Toxicol. Lett.* 198, 127–133.
- Wang, Q., Green, R.P., Zhao, G., Ornitz, D.M., 2001. Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Dev. Camb. Engl.* 128, 3867–3876.
- Wardell, R.E., Seegmiller, R.E., Bradshaw, W.S., 1982. Induction of prenatal toxicity in the rat by diethylstilbestrol, zeranol, 3,4,3',4',-tetrachlorobiphenyl, cadmium, and lead. *Teratology* 26, 229–237.
- Watson, C.S., Jeng, Y.-J., Hu, G., Wozniak, A., Bulayeva, N., Guptarak, J., 2012. Estrogen- and xenoestrogen-induced ERK signaling in pituitary tumor cells involves estrogen receptor- α interactions with G protein- α i and caveolin I. *Steroids* 77, 424–432.
- Watson, G.H., Muldoon, T.G., 1985. Specific binding of estrogen and estrogen-receptor complex by microsomes from estrogen-responsive tissues of the rat. *Endocrinology* 117, 1341–1349.
- Weil, D., Bernard, M., Combates, N., Wirtz, M.K., Hollister, D.W., Steinmann, B., Ramirez, F., 1988. Identification of a mutation that causes exon skipping during collagen pre-mRNA splicing in an Ehlers-Danlos syndrome variant. *J. Biol. Chem.* 263, 8561–8564.
- Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E., Richter, W., 2010. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 223, 84–93.
- Weng, T., Yi, L., Huang, J., Luo, F., Wen, X., Du, X., Chen, Q., Deng, C., Chen, D., Chen, L., 2012. Genetic inhibition of fibroblast growth factor receptor 1 in knee cartilage attenuates the degeneration of articular cartilage in adult mice. *Arthritis Rheum.* 64, 3982–3992.

- Wickerham, E.L., Lozoff, B., Shao, J., Kaciroti, N., Xia, Y., Meeker, J.D., 2012. Reduced birth weight in relation to pesticide mixtures detected in cord blood of full-term infants. *Environ. Int.* 47, 80–85.
- Wong, C., Kelce, W.R., Sar, M., Wilson, E.M., 1995. Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J. Biol. Chem.* 270, 19998–20003.
- Yan, D., Chen, D., Cool, S.M., van Wijnen, A.J., Mikecz, K., Murphy, G., Im, H.-J., 2011. Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 13, R130.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., Ornitz, D.M., 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841–848.
- Ye, L., Chan, M.Y., Leung, L.K., 2009. The soy isoflavone genistein induces estrogen synthesis in an extragonadal pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* 302, 73–80.
- Yeh, B.K., Igarashi, M., Eliseenkova, A.V., Plotnikov, A.N., Sher, I., Ron, D., Aaronson, S.A., Mohammadi, M., 2003. Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2266–2271.
- Yoon, B.S., Pogue, R., Ovchinnikov, D.A., Yoshii, I., Mishina, Y., Behringer, R.R., Lyons, K.M., 2006. BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. *Dev. Camb. Engl.* 133, 4667–4678.
- Yu, S., Xing, X., Dong, G., Weng, X., Wang, M., 2012. Excess genistein suppresses the synthesis of extracellular matrix in female rat mandibular condylar cartilage. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 918–923.
- Zaucke, F., Grässel, S., 2009. Genetic mouse models for the functional analysis of the perifibrillar components collagen IX, COMP and matrilin-3: Implications for growth cartilage differentiation and endochondral ossification. *Histol. Histopathol.* 24, 1067–1079.
- Zhang, Y., Chen, W.-F., Lai, W.-P., Wong, M.-S., 2008. Soy isoflavones and their bone protective effects. *Inflammopharmacology* 16, 213–215.
- Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., De Crombrughe, B., 1997. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 209, 377–386.
- Zheng, Z., Cohn, M.J., 2011. Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16289–16294.
- Zhou, G., Lefebvre, V., Zhang, Z., Eberspaecher, H., de Crombrughe, B., 1998. Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 14989–14997.
- Zhou, M., Sutliff, R.L., Paul, R.J., Lorenz, J.N., Hoying, J.B., Haudenschild, C.C., Yin, M., Coffin, J.D., Kong, L., Kranias, E.G., Luo, W., Boivin, G.P., Duffy, J.J., Pawlowski, S.A., Doetschman, T., 1998. Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat. Med.* 4, 201–207.
- Zhu, Y., Oganessian, A., Keene, D.R., Sandell, L.J., 1999. Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propeptide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF-beta1 and BMP-2. *J. Cell Biol.* 144, 1069–1080.

Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607–612.

Résumé :**Effets de perturbateurs endocriniens sur le développement du squelette.**

Les polluants environnementaux, en particulier les perturbateurs endocriniens (PE), peuvent agir à très faibles doses sur des cibles multiples. Les effets rapportés portent en majorité sur les organes de reproduction. Très peu d'études ont porté sur le squelette alors que le cartilage et l'os sont sous un puissant contrôle hormonal, depuis le stade fœtal où le système hormonal se met en place jusqu'au vieillissement, en passant par la naissance (hormones thyroïdiennes, hormone de croissance), la puberté et la ménopause chez la femme (stéroïdes sexuels).

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de polluants anti-androgènes (Vinclozoline, V et métabolite actif M2) ou xénostrogènes (Génistéine, G; Bisphénol A, BPA), *in vivo* sur le développement du squelette du rat Wistar et *in vitro* sur les marqueurs de différenciation chondrogéniques.

Les effets *in vivo* ont été étudiés à des doses 12 à 1200 fois inférieures aux "No Observed Adverse Effect Levels" (NOAEL) fixés par les instances européennes (EFSA) et internationales (US EPA). Des rattees ont été exposées à V, G seuls, combinés (GV) et/ ou associés au BPA (BGV), et ce de la conception des petits jusqu'à leur sevrage (J30) ou leur sacrifice (J30, J110). Les effets ont été recherchés sur des petits de mères et portées différentes, quatre pour chaque traitement, âge et sexe.

Les effets *in vitro* du métabolite M2 de la Vinclozoline, associé ou non avec G et BPA, ont été étudiés sur l'expression de marqueurs chondrogéniques en utilisant : 1) un modèle murin de cellules souches inductibles vers la voie chondrogénique (C1) pour les effets sur la différenciation chondrogénique précoce et 2) des chondrocytes de souriceaux nouveau-nés, différenciés en culture primaire ou dédifférenciés (passages répétés). Comparaison avec les effets du bFGF, facteur de dédifférenciation chondrogénique.

Résultats : *In vivo*, l'exposition à V, seule ou associée à G ou au BPA induit chez les rattees F1 exposées, une cannelure de la queue, discrète mais perceptible à la palpation en regard de chaque articulation intervertébrale. Les xénostrogènes tendent à réduire cet effet de V. Les rats et les animaux F2 ne sont pas atteints. L'examen par micro CT-scan montre une augmentation significative de la largeur des apophyses transverses (ITA) des vertèbres, et une diminution de la hauteur des corps vertébraux chez les rattees F1 exposées en regard des contrôles. Ces modifications anatomiques rappellent certaines pathologies génétiques des collagènes (dysplasies épiphysaires) chez l'homme. Elles sont absentes chez les rats F1 et les animaux F2. Elles sont en partie transitoires car présentes à J30 (effets sur ITA et longueur) quand seul l'effet sur l'ITA perdure à J110.

L'examen histologique des cartilages de croissance des corps vertébraux montre un déséquilibre entre les zones de prolifération et d'hypertrophie qui évoque une modification de la maturation du cartilage de type estrogénique. Ces effets sont ici aussi transitoires et majoritairement observés chez les rattees. L'effet plus prononcé du BPA lisse toutes les autres activités. Cela suggère que les PE pourraient moduler la différenciation du cartilage de croissance. C'est ce qui a été étudié *in vitro*.

In vitro. Le premier objectif était d'évaluer les effets des PE sur le processus d'induction chondrogénique (cellules C1). Nous montrons que l'addition de M2 seul ou avec G ou BPA modifie le processus de maturation du collagène2 sans effet sur les autres marqueurs (SOX9, Agrécane, Col10). M2 prolonge l'expression de COL2A immature et retarde son remplacement par l'isoforme COL2B. Le second objectif était d'étudier les effets des PE sur la régulation de l'expression de COL2A dans les chondrocytes. L'expression de COL2A augmente avec le degré de dédifférenciation cellulaire (passages successifs) et double en présence de M2, G et BPA. Cet effet dépend des récepteurs aux estrogènes (ER) et des voies p38-MAPK. Les PE pourraient donc agir par l'intermédiaire de l'ER α membranaire couplé au système cavéoline/p38. Des effets similaires sont observés en présence de bFGF. Nos données suggèrent que le bFGF et les PE modulent la différenciation chondrogénique au niveau de l'expression de COL2A sans effet sur le COL2B. Ces effets pourraient être en partie médiés par une protéine du splicing.

Conclusion : Les PE pourraient interférer avec la différenciation du cartilage de croissance et donc le développement du squelette, en retardant la maturation du collagène de type 2. La persistance du COL2A pourrait induire une fragilisation ultérieure à bas bruit de l'ossature, lors du vieillissement. Ce COL2A en excès, ayant une affinité pour les facteurs de croissance, pourrait séquestrer ces facteurs et influencer sur la vitesse de dégradation du cartilage dans des pathologies telles que l'arthrose.

Abstract :**Effects of Endocrine Disruptors on skeletal development**

Environmental pollutants, particularly Endocrine Disruptors (ED), show effects on multiple targets at very low doses. Mostly known effects target reproductive organs. Very few studies are conducted on skeleton, although cartilage and bone are under potent hormonal control, from fetal stage, where hormonal system takes place, until aging, through birth stage (thyroid hormones, growth hormones), puberty and menopause for women (steroid hormones).

The aim of this work is to study effects of anti-androgenic pollutants (Vinclozolin, V, and its active metabolite M2) or xenoestrogens (Genistein, G; Bisphenol A, BPA), *in vivo* on Wistar rat skeletal development and *in vitro* on chondrogenic differentiation markers.

***In vivo* effects** were studied on doses 12 to 12,000-fold below “No Observed Adverse Effect Levels” (NOAEL) decided by European and American agencies (EFSA and US EPA respectively). Female rats were exposed to V and G alone, in combination (GV) and/or associated to BPA (BGV), from pups conception until weaning (d30) or sacrifice (d30, d110). Effects were investigated on offsprings from different mothers and litters, on four animals by treatment, age and gender.

***In vitro* effects** of M2 metabolite of Vinclozolin, combined or not to G and BPA, were studied on chondrogenic markers expression using : 1) inducible murine stem-cells model towards chondrogenesis (C1) to study effects on early chondrogenic differentiation and 2) post-natal mouse differentiated chondrocytes, in primary culture or dedifferentiated chondrocytes by successive passages. Comparison with bFGF.

Results : *In vivo*, exposure to V, alone or combined to G or BPA, induce discrete but palpable annealing in F1 treated female rat tails, in front of each intervertebral articulation. Xenoestrogens tend to decrease V effect. Male rats and F2 offsprings were not affected. Micro-CT Scan analysis shows significative increase of vertebrae inter transverse apophyses (ITA) distance, and decrease of vertebral body height in F1 female rats comparing to control animals. Anatomical modifications recall human collagen genetic diseases (epiphyseal dysplasias). They are absent in F1 male rats and F2 offsprings. Furthermore they are partly transient, ITA and height effects being present at d30 whereas ITA effect alone remains until d110. Histological analysis of vertebral body growth plate shows unbalance between proliferative and hypertrophic zones, which evokes estrogenic acceleration of cartilage maturation. Those effects are still transient and mainly observed in female rats. BPA activity is dominant above G and V effects. This result suggests ED can modulate growth plate cartilage differentiation, which was studied *in vitro*.

***In vitro* :** First, we aimed to evaluate eventual role of ED on the process of chondrogenic differentiation. We show that M2 addition, alone or in combination with G or BPA, modifies collagen 2 maturation process without any effect on other markers (SOX9, Agrean, COL10). M2 addition extends immature isoform COL2A expression and delays its replacement by mature isoform COL2B. Second, we studied the effects of ED on the regulation of COLA expression in chondrocytes, COL2A expression increases with cell dedifferentiation degree (successive passages) and double with M2, G and BPA. No other chondrogenic marker was modified. This effect depends on estrogen receptors (ER) and p38-MAPK pathway. Thus ED could act through membrane ER α coupled to p38/caveolin system. Similar effects were observed with bFGF. Our data suggest that bFGF and ED modulate chondrogenic differentiation at the level of COL2A expression, without effect on COL2B. These effects could be partly mediated through a splicing protein.

Conclusion: ED could interfere with growth plate cartilage differentiation and in consequence with skeletal development, by delaying type 2 collagen maturation. COL2A persistence could induce later weakening through aging. COL2A in excess could have affinity for growth factors and sequester them, and then modify degradation speed in pathologies like osteoarthritis.

Mots clés (français) : cartilage, plaque de croissance, collagène de type 2, maturation, NOAEL, vinclozoline, xenoestrogènes.

Keywords : cartilage, growth plate, type 2 collagen, maturation, NOAEL vinclozolin, xenoestrogens